



**HAL**  
open science

# Découverte de nouveaux chalcophores de type méthanobactine chez les non-méthanotrophes : construction d'un système d'expression hétérologue

Victor Sayous

► **To cite this version:**

Victor Sayous. Découverte de nouveaux chalcophores de type méthanobactine chez les non-méthanotrophes : construction d'un système d'expression hétérologue. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01452284

**HAL Id: dumas-01452284**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01452284>**

Submitted on 1 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux  
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2016

N°129

Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Victor Sayous

Né le 14 aout 1991 à PAU

Découverte de nouveaux chalcophores de type  
méthanobactine chez les non-méthanotrophes :  
construction d'un système d'expression hétérologue

Directrice de thèse : Docteur Yanyan Li, CR au CNRS

**Jury,**

M. Jean-Michel Mérillon, Professeur à l'Université de Bordeaux	Président
M. Pierre Waffo-Teguo, Professeur à l'Université de Bordeaux	Rapporteur
Mme. Emmanuelle Pauliat, Pharmacienne	Rapporteur
Mme. Yanyan Li, CNRS	Directrice de Thèse

# Remerciements

Cette thèse n'aurait pu avoir lieu sans l'aide de nombreuses personnes.

En premier lieu, la directrice de l'équipe MDCEM qui est aussi ma directrice de stage, le Docteur Yanyan Li. Un grand merci Yanyan pour ta disponibilité et la qualité de ta pédagogie mais également lors de discussions au sujet du stage, de sciences ou de bien d'autres choses.

Merci aussi pour la confiance et les libertés que tu m'as laissées.

Je tiens à remercier Jean-Michel Mérillon pour avoir accepté de présider le jury. Merci également pour votre accueil chaleureux au GESVAB durant toutes ces années de pharmacie. Merci pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mon parcours.

Un grand merci à Pierre Waffo-Teguo, rapporteur de ma thèse. C'est toi Pierre qui m'a donné la vocation de la recherche. Depuis 5 ans maintenant tu as toujours été disponible et attentif. Tu m'as accompagné dans mes projets. Tu m'as initié à la Phytochimie et grâce à ton aide je me suis épanoui dans ce domaine. Merci vraiment

Merci à Emmanuelle Pauliat, rapporteur. Tu as été mon interne à l'hôpital. Tu m'as aidé à passer cette année hospitalière, tant redoutée. Merci pour ton aide et ton dynamisme incroyable. Je me souviendrai toujours d'Ernestine !

Je tiens à remercier chaleureusement les autres membres de l'équipe MDCEM à savoir :

- Jimmy Mevaere en dernière année de thèse qui a su trouver le temps et la patience pour m'aider, quel que soit le moment.
- Stéphane Mann et Didier Buisson pour leurs discussions et leur enthousiasme.

Une pensée pour ma grand-mère qui malgré ses encouragements permanent tout au long de ce marathon n'est plus là pour assister à l'arrivée. Papi est là pour toi.

Enfin, un grand merci à mon père pour son « coaching » sans relâche et à ma mère pour m'avoir toujours poussé au meilleur. Bien sûr, je n'oublie pas le reste de ma famille pour son soutien tout au long de mes études.

## RESUME

**Mots-clés :** Méthanobactines, chalcophore, *Pseudomonas extremaustralis*, expression hétérologue, recombinaison homologue, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*

Les métaux de transition comme le cuivre et le fer sont essentiels pour la survie des bactéries dans les niches écologiques. Les méthanobactines produites par des bactéries méthanotrophes sont le seul exemple de peptide chalcophore complexant spécifiquement le cuivre avec une haute affinité. Elles jouent un rôle majeur dans la physiologie et l'écologie des méthanotrophes, qui ont un fort besoin en cuivre pour réaliser l'oxydation du méthane. Toutefois, l'analyse génomique a révélé que des chalcophores apparentés existeraient chez certaines bactéries non-méthanotrophes comme chez *Pseudomonas extremaustralis*. Afin de comprendre la chimio-diversité de ces peptides, ce stage a pour but de construire un système d'expression hétérologue chez *Escherichia coli* pour le cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse d'un peptide apparenté à la méthanobactine d'origine de *P. extremaustralis*. Le stage a permis de mettre en place un protocole de clonage par recombinaison homologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et d'appliquer cette méthode pour insérer le cluster entier dans le vecteur d'expression. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives pour la découverte de nouveaux peptides apparentés aux méthanobactines.

## ABSTRACT

**Keywords:** Methanobactins, chalcophore, *Pseudomonas extremaustralis*, heterologous expression, homologous recombination, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*.

Transition metals such as copper and iron are essential for bacteria survival in their ecological niches. The methanobactins produced by the methanotrophic bacteria are the only example of chalcophores that specifically chelate copper with high affinity. They play an important role in the physiology and the ecology of the methanotrophs which have a strong need for copper in order to make the oxidation of methane. Genome analyses revealed that the related chalcophores exist in some non-methanotroph bacteria such as *Pseudomonas extremaustralis*. In order to understand the chemo-diversity of these peptides, this internship aimed to develop a system of heterologous expression in *Escherichia coli* for the gene cluster of the methanobactin-like peptide originating from *P. extremaustralis*. We have established a cloning protocol based on the homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* and have applied this method to insert the whole gene cluster into an expression vector. The obtained results open the perspective to discover and characterize the related methanobactin-like peptide.

# Abréviations

5 FOA : 5-Fluoroorotic acid  
5-FU : 5-fluorouracile  
A : Adénine  
ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique  
AGAP : Any-gene-any-plasmid  
ARN : Acide ribonucléique  
ATP : Adénosine triphosphate  
CYS : Cystéine  
C : Cytosine  
D-PA : D-pénicillamine  
ECF : Extracytoplasmic function  
Kb : kilo base  
FD : Fast digest  
G : Guanine  
GLY : Glycine  
LC-MS : Liquid chromatography couplé à la spectrométrie de masse  
MATE : Multidrug And Toxic Compound Extrusion  
Mbns : Méthanobactines  
MFS : Major facilitator superfamily  
MMO : Methane monooxygénase  
NRPS : Non ribosomal peptide synthetase  
ODCase : Orotidine 5'-phosphate decarboxylase  
ORF : Open reading frame  
PCR : Polymerase chain reaction  
RBS : Ribosome binding site  
PEG : polyéthylène glycol  
RiPPs : Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
RND : Resistance/nodulation/cell division  
SER : Sérine

T : Thymine

TAR : Transformation associated recombinaison

TBDTS :TonB dependant transporters

TETA : triéthylène tétramine dihydrochloride

URA : Uracile

YCC : Yeast cloning cassette

# **Partie I**

## **Généralités sur les métallophores**

# Partie I

I	Introduction générale.....	10
II	Généralités sur les métallophores.....	11
II.1	Métaux de transition dans la physiologie bactérienne.....	11
II.2	Les métallophores et la biodisponibilité des métaux.....	13
II.3	L'importance des métallophores dans l'interaction hôte pathogène.....	16
III	Diversité des métallophores bactériens.....	17
III.1	Relations entre structures et spécificité.....	17
III.1.1	Le degré de valence.....	17
III.1.2	Taille et flexibilité.....	20
III.1.3	Environnement compétitif.....	21
III.2	Fer, Molybdène, Vanadium chez les bactéries fixant l'azote.....	22
III.2.1	Le Nickel chez <i>Escherichia coli</i> .....	24
III.3	Le cobalt chez les bactéries marines et les cyanobactéries.....	24
	Export et import des métallophores.....	25
III.4	Généralités.....	25
III.5	Les mécanismes d'export et d'import chez les Gram-négatifs.....	26
III.5.1	L'export des métallophores.....	26
III.5.2	L'import : Transport actif des complexes métallophore-métal.....	27
IV	Valorisation des métallophores.....	30
IV.1	Les métallophores et les contaminants métalliques : mobilisation, import et bioremédiation.	
	30	
V	Conclusion Partie I.....	31

# Partie II

I	Le cuivre et les bactéries.....	33
I.1	Rôle du cuivre chez les bactéries.....	33
I.2	L'homéostasie du cuivre chez les bactéries.....	35
I.3	Toxicité du cuivre chez les bactéries.....	36
II	Cuivre, méthanobactines et méthanotrophes.....	37
II.1	Méthanotrophes et méthanobactines.....	37
II.2	Le système génétique des méthanobactines.....	38
II.2.1	Export.....	39
II.2.2	Import.....	39
II.2.3	Régulation.....	39

II.2.4 Biosynthèse .....	40
II.3 La distribution et la diversité des méthanobactines chez les bactéries .....	42
III Application des méthanobactines .....	43
III.1 Exemple d'une application médicale d'un chalcophore : la méthanobactine OB3b : la maladie de Wilson. ....	43
III.1.1 Définition et épidémiologie de la maladie de Wilson.....	44
III.1.2 Eléments de diagnostics .....	44
III.1.2.1 Manifestations cliniques .....	44
III.1.2.2 Données biologiques .....	45
III.1.3 Traitements bénéficiant d'une AMM.....	47
III.1.3.1 Régime .....	47
III.1.3.2 Traitements chélateurs du cuivre .....	47
III.1.3.3 Recherche pour de nouveaux traitements. ....	48
III.1.3.4 Utilisation d'une méthanobactine pour traiter l'hépatite fulminante induite par WD chez le rat.49	
III.2 Application biotechnologique d'une méthanobactine. ....	51
IV Les travaux de recherche au sein du MDCEM.....	52
IV.1 Le modèle d'étude en laboratoire .....	52
IV.2 Genome mining et expression hétérologue.....	53
IV.3 Objectifs.....	54
IV.3.1 Stratégie de construction du système d'expression hétérologue .....	54
IV.3.1.1 TAR clonage.....	54
IV.3.1.2 Méthode AGAP .....	56
IV.3.1.3 Construction d'un système d'expression hétérologue par recombinaison homologue du cluster natif.....	57
IV.3.1.4 Construction d'un système d'expression hétérologue par clonage à l'aide d'enzymes de restrictions.....	57
V Matériel et méthodes .....	58
V.1 Réactifs chimiques et biologiques .....	58
V.2 Méthodes de biologie moléculaire .....	59
V.2.1 Généralités sur les réactions en chaîne par polymérase.....	59
V.2.2 Procédure de clonage classique.....	59
V.2.3 Préparation des fragments d'ADN pour le clonage AGAP .....	60
V.2.4 Transformation de la levure pour le clonage AGAP.....	60
V.2.5 II.2.5 Vérification des plasmides recombinants chez la levure.....	61

V.2.6	Extraction d'ADN génomique de <i>P. extremaustralis</i> .....	61
V.2.7	Capture directe par TAR cloning (Transformation-associated recombination).....	62
VI	Résultats.....	63
VI.1	Construction d'un système d'expression par capture directe .....	63
VI.1.1	Construction du vecteur d'expression pACYC AGAPv1_Mbt.....	63
VI.1.2	Construction du vecteur d'expression pACYC AGAPs3_Mbt .....	69
VI.1.3	Construction du vecteur d'expression pCOLA AGAPv1_Mbt.....	70
VI.2	Construction par recombinaison homologue chez la levure du cluster natif.....	71
VI.3	Construction d'un système d'expression par clonage à l'aide d'enzymes de restriction .....	71
VI.3.1	Préparation des inserts par PCR .....	72
VI.3.2	Construction de pCOLA_mbnA.....	73
VI.3.3	Construction de pCOLA_mbnA_mbnB .....	73
VI.3.4	Construction du vecteur pET28- <i>mbnP</i> .....	73
VII	Discussions .....	74
VII.1	La recombinaison homologue pour construire un vecteur et capturer un cluster.....	74
VII.1.1	La construction des plasmides avec AGAP .....	74
VII.1.2	Le clonage TAR .....	75
VII.2	La construction du plasmide par clonage classique.....	78
VII.3	La biologie de synthèse à l'aide de la levure .....	79
VIII	Conclusion et perspectives.....	80
	REFERENCES .....	81

# I Introduction générale

Les métaux de transition sont des nutriments essentiels pour tous les êtres vivants. Les métaux sont responsables de l'intégrité structurale des protéines. Ils permettent également les transferts d'électrons et servent de catalyseurs. Plus de 30 % des protéines ont un cofacteur (des molécules d'assistance) contenant un métal de transition<sup>1</sup>. Pour survivre, les organismes doivent récupérer les métaux dans leur régime alimentaire ou leur environnement. Les êtres vivants doivent également être capables d'homéostasie pour éviter des intoxications. Des mécanismes sophistiqués sont donc mis en œuvre pour réguler les concentrations de ions métalliques dans chaque cellule.

Les métallophores pourraient être définis comme des ligands organiques de bas poids moléculaire qui ont une haute affinité pour un ion métallique. Ils ont pour fonction de fournir un organisme en ions métalliques. L'homéostasie de ces ions régulent la biosynthèse et l'excrétion de leur ligand. Ils auraient également un rôle important dans la virulence d'une souche pathogène.

A partir de cette définition, les sidérophores sont des métallophores qui sont excrétés pour permettre l'import du fer ferrique  $Fe^{3+}$ . Les sidérophores sont simplement les exemples les mieux connus d'une famille plus large de « métallophores »<sup>6</sup>. *A contrario* les phytochélateurs qui sont impliqués dans la détoxification des métaux, ne sont pas des métallophores<sup>7</sup>.

Malgré l'intérêt porté aux sidérophores, beaucoup moins de travaux ont été effectués sur la chimie et la biologie des autres métallophores<sup>5</sup>. En effet, de nombreux métaux, considérés comme toxiques à forte concentration sont également essentiels à la vie et sont requis sous forme de traces.

Les chalcophores sont des métallophores liant le cuivre (chalco- veut dire cuivre en grec). Aujourd'hui les seuls représentants de cette famille sont les méthanobactines. Elles jouent un rôle majeur dans la physiologie et l'écologie des bactéries méthanotrophes, qui ont un fort besoin en cuivre pour réaliser l'oxydation du méthane<sup>8</sup>. Toutefois, l'analyse génomique a révélé que des chalcophores apparentés existeraient chez certaines bactéries non-méthanotrophes comme chez *Pseudomonas extremaustralis*. Afin de comprendre la chimio-diversité de ces peptides, nous avons construit un système d'expression hétérologue chez *Escherichia coli* pour le cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse d'un peptide apparenté à la méthanobactine d'origine de *P. extremaustralis*. Les 6 mois de stage ont permis de mettre en place un protocole de clonage par recombinaison homologe chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et d'appliquer cette méthode pour insérer le cluster entier dans le vecteur d'expression. Les résultats obtenus ouvrirent les perspectives pour la découverte d'une

nouvelle méthanobactine.

La première partie de cette thèse s'attachera à faire un état des lieux des concepts généraux de chimie et de biologie régissant les métallobactéries en tant que famille fonctionnelle. Les sidérophores sont les métallobactéries les plus étudiés, mais ne feront pas l'objet d'attention particulière dans ce travail.

Le but est de fournir une introduction générale sur l'ensemble des métallobactéries pour apporter les informations nécessaires pour replacer dans son contexte les travaux de recherche qui seront présentés dans la deuxième partie.

Ce travail étant réalisé pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie, un chapitre portera donc sur les pathologies humaines liées au cuivre et les solutions que peuvent fournir les méthanobactéries. Peu d'études et de travaux étant disponibles, cette partie ne sera pas exhaustive. Le but étant de fournir un contexte général permettant de faire le lien entre les travaux de recherches et la santé publique.

## **II Généralités sur les métallobactéries**

### **II.1 Métaux de transition dans la physiologie bactérienne**

Les métaux de transition sont une famille d'éléments chimiques du tableau périodique. Ce sont les éléments du bloc *d*. Il s'agit de 38 éléments des périodes 4 à 7 et des groupes 3 à 12 (Tableau 1).

Tableau 1 : Tableau périodique

**Tableau périodique des éléments**

← nom de l'élément (**gas**, **liquide** ou **solide** à 0°C et 101,3 kPa)  
 ← numéro atomique  
 ← symbole chimique  
 ← masse atomique relative ou (celle de l'isotope le plus stable)

**Classification par couleur :**  
 métaux alcalins (rouge), alcalino-terreux (orange), lanthanides (rose), actinides (violet), métaux de transition (bleu), métaux pauvres (gris), métalloïdes (vert), non-métaux (jaune), halogènes (orange), gaz nobles (bleu clair).  
 primordial (gris clair), désintégration d'autres éléments (gris foncé), synthétique (gris très foncé).

Ce sont des éléments qui remplissent progressivement une sous-couche électronique *d* en dessous d'une sous-couche *s* saturée selon la règle de Klechkowski.

Contrairement aux deux premiers groupes du tableau périodique, (les métaux alcalins et les métaux alcalino-terreux), les métaux de transition (notamment des groupes 4 à 11) peuvent former des ions avec une grande variété d'états d'oxydation (-3 à +8).

Le terme métalloprotéine désigne une protéine qui comporte un ou plusieurs cofacteurs métalliques. La nature utilise souvent les métalloprotéines comme catalyseurs. Par exemple les cations métalliques sont essentiels pour réaliser dans les organismes vivants une chimie d'oxydo-réduction (implique le transfert d'électrons). Seuls les éléments métalliques présentent une large gamme d'état d'oxydation nécessaire pour ces réactions.

Les cations des éléments fer, manganèse, cuivre, zinc, magnésium, calcium ont des rôles clés dans le métabolisme des eucaryotes et des bactéries. Dans un moindre mesure le nickel, le cobalt, le molybdène, le vanadium et le tungstène sont également utilisés.

Les rôles des métaux de transition couramment cités sont multiples et le but n'est pas de faire une description exhaustive. Ils peuvent être :

- 1) transporteurs d'oxygène (par exemple, le fer est requis pour la croissance de presque toutes

les bactéries. Il est retrouvé en tant que cofacteur comme l'hème. L'hème permet d'accueillir un gaz diatomique au centre d'un large anneau organique appelé porphyrine) ;

2) cytochromes (ce sont des hèmes contenant du fer, qui sont principalement responsables de la génération d'ATP grâce au transport d'électrons).

On retrouve également les métaux de transition chez les métalloenzymes :

1) anhydrase carbonique (le zinc forme des liaisons de coordination avec trois imadazoles) ;

2) vitamine B<sub>12</sub> aussi appelée cobalamine (utilise le cobalt pour catalyser le transport de méthyles entre deux molécules) ; nitrogénases (utilise le molybdène pour fixer l'azote atmosphérique) ;

3) superoxyde dismutase (utilise le cuivre pour générer des O<sub>2</sub><sup>-</sup> qui sont des ions réactifs) ;

4) hydrogénase (peuvent utiliser le fer ou le nickel pour cliver H<sub>2</sub>).

Les métaux de transition sont utilisés par les bactéries dans de nombreux processus physiologiques. La capacité d'une souche bactérienne à acquérir de façon plus ou moins efficace ces métaux dans des environnements qui en sont pauvre est un facteur important de la virulence bactérienne.

## II.2 Les métallophores et la biodisponibilité des métaux

Les organismes récupèrent seulement les nutriments qui sont biodisponibles. Cependant la biodisponibilité n'est pas constante et identique en fonction de l'environnement et des espèces. Des nutriments disponibles pour un organisme peuvent ne pas l'être pour un autre <sup>22</sup>. De plus des nutriments disponibles à un moment donné ne le sont pas forcément dans des conditions différentes <sup>23</sup>. De façon conceptuelle, les nutriments sont distribués dans trois espaces :

1) les nutriments directement disponibles, c'est à dire qu'ils sont sous une forme qui leur permet d'être directement assimilé par un organisme (l'espace biodisponible) ;

2) l'espace potentiellement disponible qui remplit directement l'espace biodisponible sur une échelle de temps significatif (l'espace potentiellement biodisponible) ;

3) l'espace non biodisponible qui contient les nutriments qui ne peuvent pas devenir biodisponibles pour un organisme sur une échelle de temps significatif car ils sont incorporés dans une matrice minérale (l'espace bioinaccessible) <sup>24</sup>.

Lorsque la cinétique d'incorporation d'un nutriment est rapide en comparaison avec le processus de remplissage de l'espace biodisponible, l'environnement proche de l'organisme va rapidement s'appauvrir, créant un gradient de concentration <sup>25 26</sup>.

Lorsqu'ils sont secrétés, les métallobiores vont commencer un processus qui affecte l'efficacité de l'acquisition des métaux à partir de l'espace biodisponible et de l'espace potentiellement biodisponible (Figure 3).

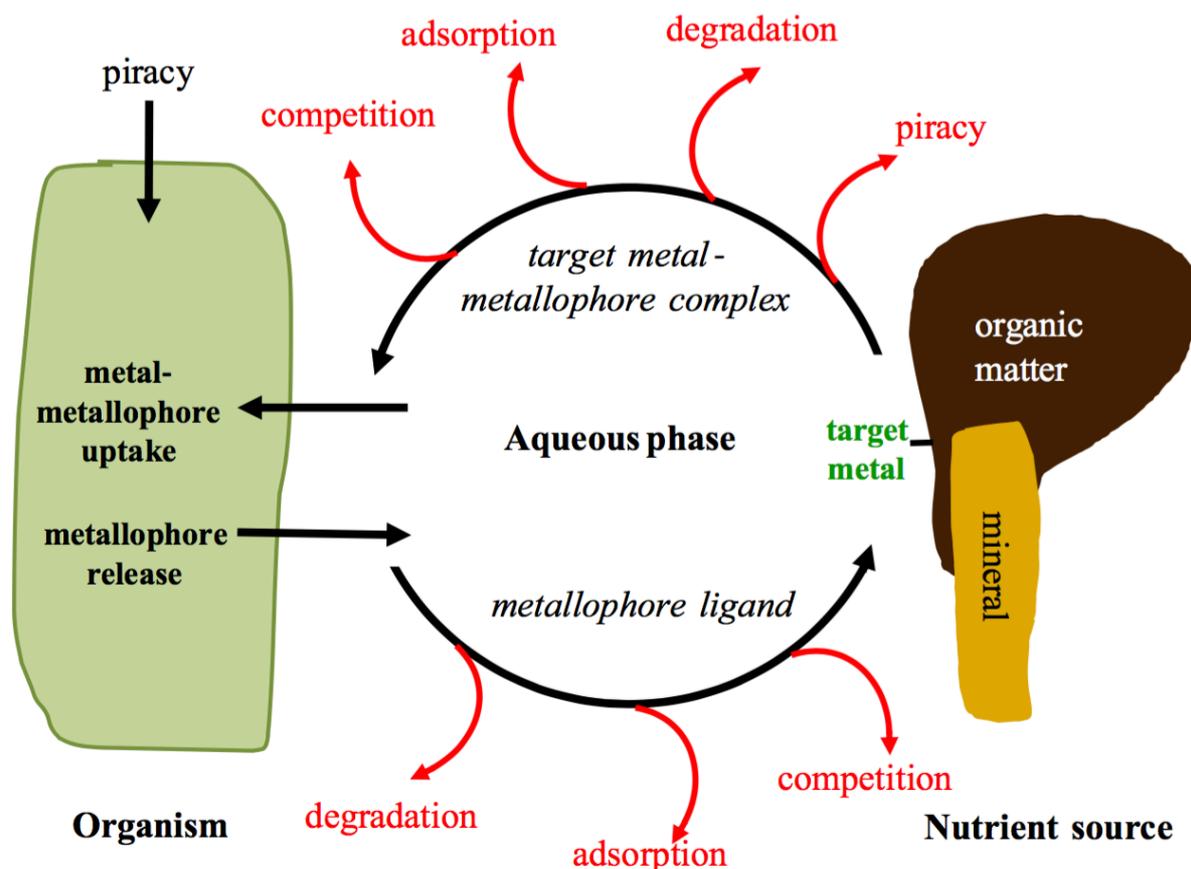


Figure 1 : Mode d'action des métallobiores. Le métallobiore est secrété par l'organisme dans l'environnement aqueux. Il va chélater l'ion métal cible. L'ensemble du complexe est ensuite importé à l'intérieur de la cellule. Cependant le ligand et le complexe sont exposés à des facteurs environnementaux qui vont diminuer l'efficacité du mode d'action. Ces processus sont par exemple l'adsorption, la dégradation, la compétition, le piratage des autres organismes.

Les métaux se trouvent sous une grande variété d'états dans l'environnement comme : état solide, sous forme de colloïde, de complexes dissous etc...<sup>27</sup>. Les nutriments associés avec ces phases sont considérés comme appartenant aux espaces potentiellement biodisponibles ou bioinaccessibles. Dans ces espaces, les métaux d'intérêt peuvent être à la fois sous forme adsorbés ou précipités, associés avec de la matière organique, avec de l'argile ou avec des (hydr)oxides<sup>28</sup>.

Les réactions d'adsorption et dissolution peuvent affecter profondément la capacité des métallobiores à solubiliser un métal. L'adsorption du métallobiore est un prérequis dans le processus de dissolution contrôlé par un ligand<sup>29</sup>. Plusieurs études montrent que la cinétique de dissolution initiée par un métallobiore est proportionnelle à la concentration du métallobiore adsorbé à la surface du minéral<sup>30 31 32</sup>. Cependant l'adsorption du métallobiore à la surface du minéral retient le complexe

métallophore-métal réduisant les flux de diffusion du métal cible vers l'organisme<sup>33</sup>. Cette rétention dépend de l'importance de la surface d'interactions entre les ligands et les composés réactifs de l'environnement. Ces interactions peuvent être électrostatiques, hydrophobes, chimiques etc... La charge du complexe métallophore-métal est importante car la plupart des matières organiques et des argiles minérales ont une charge négative. Cela entraîne la répulsion des complexes métallophore-métal négatifs. Au contraire ils attirent les complexes positivement chargés<sup>34</sup>.

Les métallophores peuvent être dégradés soit de façon microbienne ou chimique par des réactions photochimiques ou d'oxydoréduction<sup>35 36 37</sup>. Le mécanisme dominant de dégradation et leurs cinétiques dans des conditions naturelles ne sont pas connus pour la plupart des métallophores. La cinétique de dégradation dépend probablement d'une combinaison de facteurs environnementaux comprenant la taille et la composition de la communauté microbienne<sup>22</sup>. Cependant, certains microorganismes ont montré qu'ils étaient capables d'utiliser les métallophores comme source de carbone<sup>38</sup>.

Les métallophores peuvent augmenter l'acquisition des métaux à travers plusieurs mécanismes géochimiques et biologiques interconnectés. Tout d'abord ils peuvent faciliter la solubilisation de l'ion métallique<sup>39</sup>. Cette solubilisation peut entraîner le passage des nutriments de l'espace potentiellement biodisponible à l'espace biodisponible. Une solution plus concentrée en nutriments limite la déplétion relative de nutriments à la surface de l'organisme. De plus cela va augmenter le gradient de diffusion vers l'organisme. Enfin, les organismes peuvent avoir des récepteurs spécifiques qui facilitent l'import des complexes métallophore-métaux<sup>40</sup>.

Dans le modèle « free ion activity model » (FIAM), l'activité des ions libres est considérée comme une mesure de leur biodisponibilité car sous cette forme ils sont directement importables. L'activité des ions libres dans l'environnement peut ne pas être affectée par les métallophores (car l'activité est déterminée par la solubilité d'une phase minérale), ou bien diminuer (en raison de l'augmentation de la chélation des ions due à la sécrétion des métallophores). Pour contribuer à l'import du nutriment, le complexe métallophore-métal doit être

- 1) biodisponible ce qui lui permet d'être directement importé dans l'organisme comme complexe<sup>40</sup>.
- 2) suffisamment labile de façon à ce qu'il se dissocie dans l'environnement immédiat de l'organisme<sup>41</sup>.
- 3) susceptible d'être modifié par l'organisme de façon à ce que l'ion désiré soit sous forme

biodisponible. Par exemple, certaines enzymes membranaires peuvent modifier les propriétés d'une complexe métallophore-métal en le réduisant de façon à le rendre moins stable <sup>42</sup>.

Les organismes peuvent être affectés par la production de métallophores provenant d'autres organismes à proximité. Pour qu'un organisme bénéficie de la production d'un autre organisme il doit développer des transporteurs adaptés. Par exemple certaines bactéries développent des transporteurs pour des xénosidérophores <sup>43</sup>. Les espèces de bactérie de *Yersina* ne produisent pas de sidérophores catécholate ou hydroxamate, mais sont tout de même capables d'importer ces complexes <sup>44</sup>. Certains actinomycètes diminuent leur production de sidérophores lorsqu'ils sont capables d'importer des sidérophores produits par une autre espèce <sup>45</sup>. Cela suggère qu'il y a une compétition pour le fer, traduite par le piratage des sidérophores. De plus un sidérophore spécifique à une espèce peut altérer l'expression génique des sidérophores d'une autre souche.

## **II.3 L'importance des métallophores dans l'interaction hôte pathogène.**

Les bactéries pathogènes doivent faire face à une limitation supplémentaire mise en place par l'organisme hôte pour prévenir le développement des bactéries. Cette stratégie d'« immunité nutritionnelle » se traduit par des mécanismes spécialisés de séquestration comme pour le fer, le manganèse ou le zinc <sup>2</sup>. L'acquisition du fer est un bon exemple de cette guerre pour l'acquisition des métaux dans des environnements pauvres. La bactérie va synthétiser des sidérophores qui ont une très grande affinité pour le fer ferrique  $Fe^{3+}$ . Ce sont des peptides sécrétés dans l'environnement extracellulaire, puis réimportés sous forme de complexe avec le fer <sup>3</sup>. Les sidérophores sont souvent associés avec la virulence et peuvent aussi dans certains cas importer d'autres métaux <sup>4 5</sup>.

Le système immunitaire de l'homme a évolué pour réduire la biodisponibilité des métaux de transition pour les bactéries pathogènes. Les métaux de transition de Mn(II) à Zn(II) sont des cofacteurs pour les métalloenzymes que l'on retrouve dans toutes les cellules vivantes. L'organisme pathogène est capable de développer une stratégie efficace pour lutter contre « l'immunité nutritionnelle » développée par l'hôte. Il semble de plus en plus évident que l'hôte essaie de rendre Mn, Fe, et Zn moins biodisponibles alors qu'au contraire il utilise le Cu pour tuer les micro-organismes invasifs.

Les études de génétique et de métabolomique associent la production de sidérophores avec la

virulence chez de nombreux pathogènes humains, comme par exemple *E. coli* et les bactéries Gram-négatifs<sup>50</sup>. L'expression d'un seul type de sidérophores est suffisant pour l'acquisition de Fe *in vitro*. Pourtant de nombreuses souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC) produisent de nombreux types de sidérophores différents dont la yersiniabactine (Ybt) qui est un sidérophore associé à la virulence. La co-expression de ce sidérophore portant un groupe catécholate est d'autant plus surprenante qu'en condition physiologique, Ybt est capable de chélater Cu(II).

L'expression de Ybt correspond à des souches d'UPEC possédant une résistance élevée au cuivre. Alors qu'Ybt est sidérophore liant principalement le fer, son rôle pourrait être différent lorsque celui-ci se lie au cuivre. Il jouerait alors un rôle de séquestration favorable à la survie de l'organisme pathogène<sup>51</sup>.

La staphylopine est un métallopeptide proche de la nicotiamine identifiée chez *Staphylococcus aureus*. Il est impliqué dans l'acquisition de Ni, Co, Zn, Cu et Fe en fonction des conditions de croissance de la bactérie. Même si l'importance de ce métallopeptide n'a pas encore été démontrée dans la virulence de *S. aureus*, des gènes homologues à ceux impliqués dans la biosynthèse de la staphylopine sont bien conservés chez *Yersinia pestis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ceci accentue l'influence probable de ce métallopeptide dans les mécanismes de pathogénicité. D'autre part un mécanisme d'export similaire à celui de la staphylopine est indispensable à la croissance de *P. aeruginosa* dans les mucus des voies respiratoires qui sont très pauvres en ions métalliques<sup>52</sup>.

### **III Diversité des métallopeptides bactériens**

#### **III.1 Relations entre structures et spécificité.**

##### **III.1.1 Le degré de valence**

La grande affinité et la spécificité pour un ion métallique sont les propriétés classiques des métallopeptides. La spécificité d'un ligand pour un ion métallique est contrôlée par plusieurs facteurs mettant en jeu à la fois la structure du métallopeptide et les caractéristiques de l'ion métallique.

Un paramètre important est le degré de valence de coordination selon le concept acide-base de Pearson (théorie HSAB). La dureté ou la faiblesse d'un métal et de son ligand dépendent de leur tendance à former des liaisons avec des composés, respectivement, plus ioniques ou covalents.

Les ions acides forts comme Pu<sup>4+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> et Co<sup>3+</sup> sont caractérisés par un ratio

important de la charge et du rayon atomique ( $z/IR$ , ratio charge-rayon atomique), une électronégativité importante ainsi qu'une faible polarisabilité. Ils contiennent une forte affinité pour les donneurs forts comme l'oxygène. L'affinité des ligands avec des groupes donneurs contenant de l'oxygène, comme les sidérophores microbiens et les chélateurs carboxyliques est souvent fortement corrélée au ration charge-rayon atomique de l'ion métallique (Figure 1)<sup>9 10</sup>.

Paradoxalement ce type de relation peut conduire à ce que des métalophores aient une affinité plus importante pour d'autres composés métalliques. Par exemple, le sidérophore desferrioxamine-B (DFOB) a une forte affinité pour  $Fe^{3+}$ , mais possède une affinité encore plus grande pour  $Pu^{4+}$  (oxyde de plutonium)<sup>11</sup>. Cela sous-entend que même si l'affinité pour le métal cible est grande, d'autres métaux peuvent compromettre la sélectivité. La pyoverdine PV1 est capable de lier des métaux différents du fer qui ont une affinité moindre que celle de  $Fe^{3+}$ .

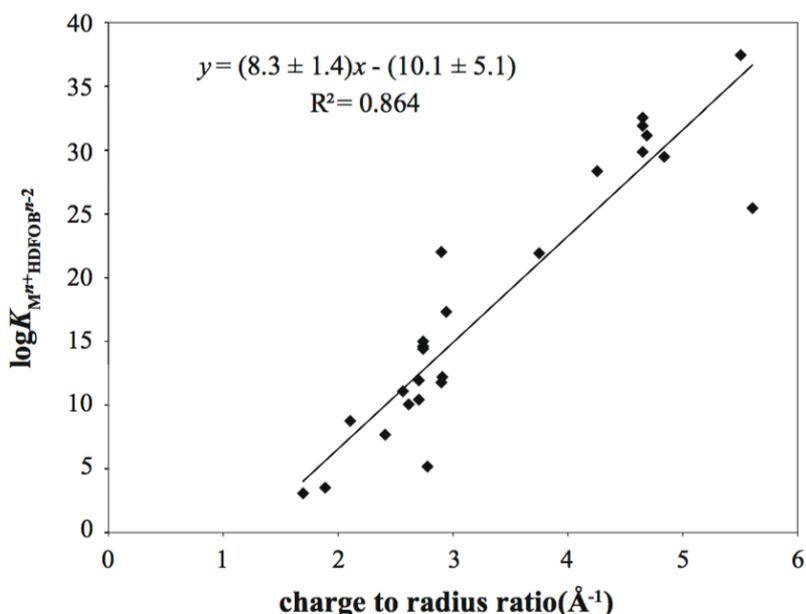


Figure 2 : Corrélation entre le ration de la charge ionique et le rayon atomique et la constante de stabilité pour  $M^{n+}HDFOB^{n-2}$

Des métaux non ferriques sont capable d'empêcher *P. aeruginosa* de récupérer du fer provenant de son environnement<sup>12</sup>. De façon similaire, dans certains sols calcaires, l'acide deoxymugénique (DMA) favorise la liaison avec des ions comme Cu, Co et Ni à la place de l'ion « physiologique » qui est  $Fe$ <sup>13</sup>.

A l'inverse, les ions acides faibles, comme  $Cu^+$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Hg^{2+}$ , sont caractérisés par un ratio charge-rayon d'atome plus petit, une électronégativité plus faible, et un grand degré de polarisabilité. Ils ont une plus grande affinité pour des ligands faibles contenant des atomes de soufre sous forme réduite ainsi que des atomes d'azote, comme les groupes thiolates et cyanures. Ce sont des composés qui ont

des caractères plus covalents. Selon la théorie HSAB, l'azote est un donneur important pour des ions divalents de dureté intermédiaire comme Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) et Zn(II).

L'utilité de ce concept est illustrée par l'observation des sidérophores liants Fe(III) qui contiennent souvent des atomes d'oxygène donneurs que l'on retrouve dans des groupes comme les acides hydroxamiques, les catécholates et les acides  $\alpha$ -hydroxycarboxylique. Au contraire les chalcophores liant Cu, contiennent des atomes de soufre et d'azote comme groupes donneurs (Figure 2). Cette analyse démontre que la sélectivité des métallophores pour un métal donné dépend des interactions chimiques entre les spécificités des ions métalliques et les groupes donneurs des métallophores.

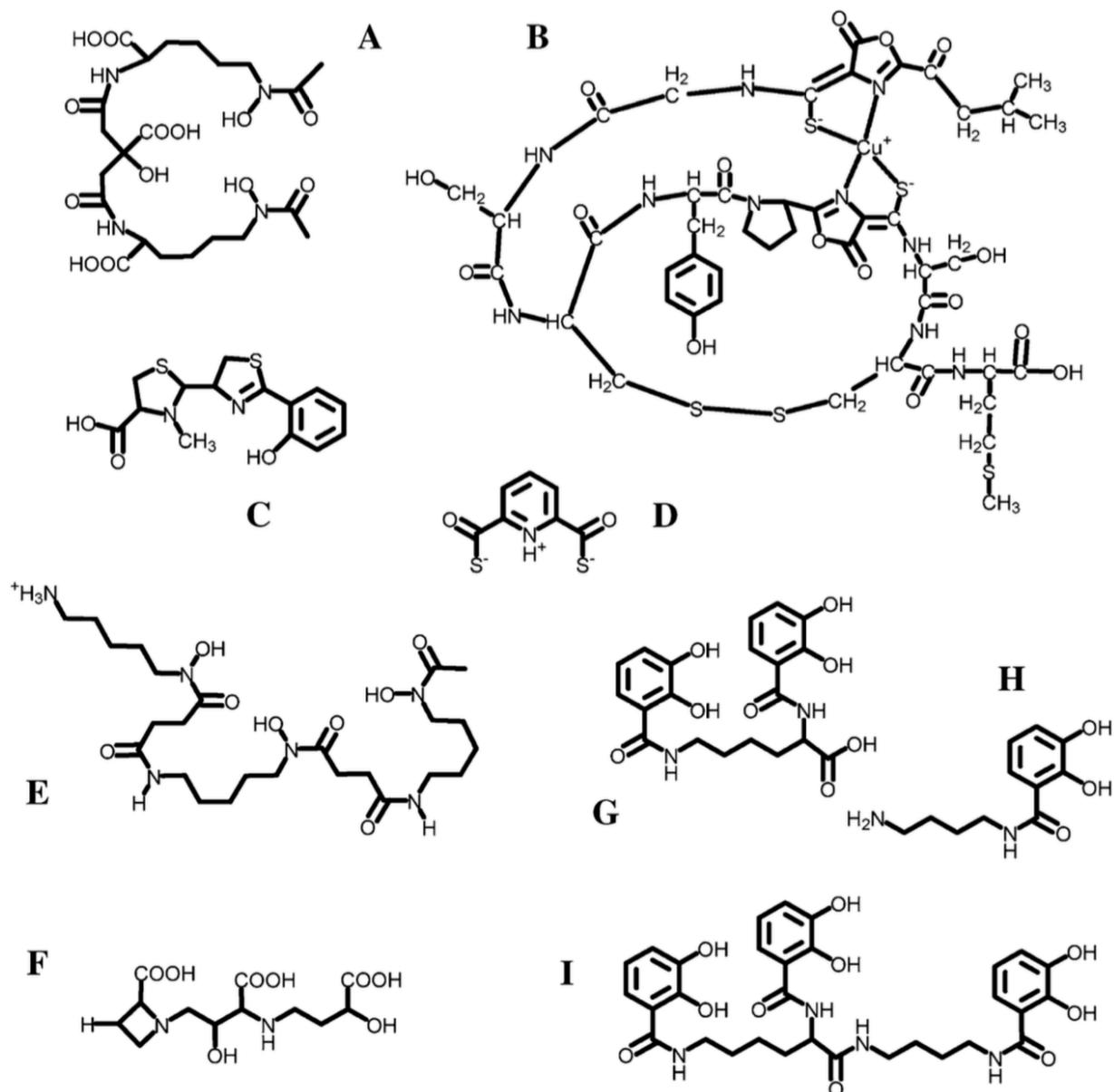


Figure 3 : Exemple de structure de métallope : a) aerobactin, b) methanobactine OB3b, c) pyochelin, d) pyridine-2,6-bisthiocarboxylique (PTBC), e) desferrioxamine-B (DFOB), f) acide mugineic, g) azotochelin, h) aminochelin, i) protochelin

### III.1.2 Taille et flexibilité

La théorie HSAB ne prend en compte que la nature des liaisons de coordination. La géométrie du ligand joue également un rôle dans les interactions avec le métal. La nature et le nombre de groupes donneurs contrôlent partiellement les interactions spatiales du métallope avec l'ion métallique en fonction de sa taille et de sa configuration électronique <sup>14</sup>. Par exemple, le sidérophore hexadenté DFOB forme un complexe octaédrique avec le fer, satisfaisant ainsi les valences de coordination de

Fe(III). Des DFOB synthétiques qui ont un groupe bidenté additionnel possèdent une affinité augmentée pour des ions actinides (les métaux lourds) qui peuvent faire plus de liaisons de coordinations que Fe(III)<sup>15</sup>. D'autre part, des structures annulaires composées de plusieurs groupes chélateurs sont capables de meilleures interactions avec des petits ions métalliques. Ainsi, des structures annulaires composées de six groupes comme ceux que l'on observe chez les acides citriques sont adaptées pour lier des petits ions comme Fe ( $IR \leq 0,6 \text{ \AA}$ ). Au contraire, des structures composées de quatre groupes sont plus efficaces pour lier des métaux plus grands ( $IR \geq 1,0 \text{ \AA}$ )<sup>16</sup>. Le cuivre possède un rayon atomique intermédiaire et est chélaté par des structures à six ou cinq membres (comme les chalcophores)<sup>17</sup>.

La façon dont un métallope est capable de satisfaire les conditions de liaison avec un ion métallique dépend aussi de la structure globale et de sa flexibilité. La composition et la taille de la chaîne qui connectent les différents groupes donneurs, bien que moins importantes que la nature des groupes donneurs, jouent aussi un rôle dans les constantes de liaison pour les différents métaux<sup>18 19</sup>. Les effets de la flexibilité peuvent être observés sur les structures les plus communes des sidérophores. Les catécholates sont très rigides en raison de l'état d'hybridation du phényle et de la délocalisation de la densité électronique à travers le système conjugué. Cette rigidité est idéale pour un système de coordination octaédrique, comme c'est le cas pour le fer. Les groupes donneurs acides  $\alpha$ -hydroxycarboxylique ont au contraire une délocalisation électronique minimale ce qui rend ce type de groupe très flexible. Cette flexibilité convient à des structures différentes des coordinations octaédriques, comme les distorsions de Jahn-Teller (par exemple le complexe hexaaquacuire(II)). De plus, les chalcophores flexibles forment des complexes distordus tétraédriques avec le cuivre, composés de cinq groupes donneurs pour Cu(I) et de six groupes donneurs pour Cu(II)<sup>17</sup>. Les préférences concernant la géométrie des liaisons de coordination peuvent être déterminées en comparant les constantes de stabilité d'un métallope avec différents ions métalliques à différents stades d'oxydation<sup>14</sup>.

### III.1.3 Environnement compétitif

La production des métallophores est la conséquence d'une faible disponibilité d'un nutriment dans l'environnement. Cependant, la sélectivité du métallope pour ce métal est souvent limitée. La sélectivité dépend des caractéristiques structurelles, de la charge de l'ion, du rayon atomique et de la configuration. Ainsi, si le métallope est sécrété dans un environnement contenant des ions qui ont des propriétés chimiques similaires à l'ion métallique ciblé, l'efficacité de la chélation peut diminuer

en raison de la compétition d'un éventuel ion métallique non désiré<sup>9</sup>. La compétition réduit la quantité de ligand disponible pour lier le métal et peut donc forcer l'organisme à dépenser plus d'énergie pour produire davantage de métallophores.

La compréhension de la chute d'efficacité liée à la compétition d'un ion métallique non désiré peut se faire soit d'un point de vue thermodynamique ou cinétique. D'un point de vue thermodynamique, l'impact de la compétition peut être estimé à travers la modélisation d'un équilibre thermodynamique. Cependant dans un cadre temporel « biologique », l'équilibre peut ne pas être atteint, en raison de nombreux facteurs comme la différence cinétique de mobilisation des différents métaux. Par exemple, un chalcophore peut lier préférentiellement le mercure au lieu du cuivre malgré une préférence thermodynamique pour le cuivre. Cela peut être expliqué par une cinétique plus rapide de la complexation du mercure par rapport à celle du cuivre<sup>20</sup>. Ce mécanisme peut être utilisé comme mécanisme de détoxification à l'aide de méthanobactines.

Dans le cadre de cet exemple, un modèle cinétique est plus adapté. A la fois l'abondance du métal et la cinétique à laquelle il se complexe avec le métallophore sont pris en compte. De plus l'avancement de la réaction influe sur la spécificité du métallophore. Dans ce cas lorsque l'ion métallique cible est déplacé par un compétiteur, cela produit un effet négatif sur l'acquisition de l'ion métallique<sup>21</sup>. Le taux de déplacement de l'ion métallique désiré détermine la baisse de l'import du nutriment.

Les chapitres précédents étaient focalisés sur la nature des métallophores, leur chimie et leurs interactions avec les métaux sous forme de traces dans l'environnement.

Nous allons voir à présent quelques exemples, non exhaustifs, d'autres métallophores. Ceci fera office d'un rapide état des lieux sur les relations des métallophores bactériens avec des métaux moins connus que le Fer.

## **III.2 Fer, Molybdène, Vanadium chez les bactéries fixant l'azote**

Certains métallophores classifiés comme des sidérophores peuvent être impliqués dans la régulation et l'import d'autres métaux comme le molybdène (Mo) et le vanadium (V). C'est le cas pour des bactéries fixant l'azote comme *Azospirillum lipoferum* ou des bactéries de la famille *Rhizobia*<sup>53 54</sup>. Ces espèces sont connues pour produire plusieurs sidérophores de type catécholates ou mixte. Ces organismes ont un besoin important de Mo et V car ils sont utilisés par les nitrogénases, l'enzyme

responsable de la fixation de l'azote<sup>55 6</sup>. Les nitrogénases peuvent utiliser Fe et Mo ou juste Fe, dans certains cas, V peut substituer Mo, lorsque ce dernier est manquant<sup>56</sup>. L'azote est souvent le nutriment limitant dans les environnements terrestres et maritimes. La rareté du Mo (0,5-5 mg/kg dans les sols) fait que l'import de cet élément est un facteur important de la fixation de l'azote dans l'environnement<sup>27</sup>.

Des travaux récents chez *Azospirillum vinelandii* est l'exemple le plus étudié des bactéries fixant l'azote. Cette bactérie est capable de produire un tricatécholate (protochéline), un bicatécholate (azotochéline) et un métallope mixte (azotobactine) qui contient un groupe catécholate, un groupe hydroxamate et un groupe  $\alpha$ -hydroxycarboxylate (Figure 2)<sup>57</sup>. Cette bactérie produirait également d'autres ligands : deux monocatécholates, l'aminochéline et l'acide 2,3 dihydrobenzoïque (DHBA). La présence de tous ces sidérophores ont interrogé sur leur possible rôle dans l'import du Mo et sur le rôle du Mo sur l'import de Fe. Cependant les constantes de stabilité des complexes Mo sont bien plus faibles que pour les complexes avec Fe(III). L'azotochéline, la protochéline et l'azotobactine peuvent promouvoir l'import de Mo pour leur utilisation par les nitrogénases<sup>58 55 59</sup>. L'import de Mo se fait lorsqu'il est présent en faible quantité dans l'environnement ( $<10^{-8}$  M), même lorsque l'environnement est riche en fer. Toutefois lorsque les concentrations en Mo sont fortes ( $>10^{-6}$ - $10^{-5}$  M), l'import de Mo est stoppé, probablement pour éviter les effets toxiques de ce métal. Lorsqu'il n'y a pas beaucoup de Mo, ces mêmes sidérophores peuvent importer le V. Des études suggèrent que des transporteurs indépendants sont utilisés pour chacun des complexes. Chez *A. vinelandii*, un transporteur membranaire de type ABC est utilisé pour faciliter l'import de Mo, mais le lien avec le complexe métallope-Mo n'a pas été fait<sup>6</sup>.

La capacité de ces ligands à fixer le Mo ou le V est surprenante. En effet comparées à Fe(III) les constantes de stabilité de Mo et V sont bien plus faibles. Cependant une explication cinétique plutôt que thermodynamique pourrait expliquer ce phénomène<sup>6</sup>. Dans l'environnement, le Fer est vraisemblablement sous forme de phase minérale. Le Mo et le V sont probablement absorbés à la surface de ces minéraux<sup>60</sup> ou bien liés à des molécules organiques. Par conséquent le Mo et le V sont plus labiles que le Fer(III). De plus l'aminochéline a montré qu'elle était capable de dissoudre le Mo à partir de silicate Mo-Fe. Ces observations suggèrent que le Mo et le V sont capables d'être compétitifs d'un point de vue cinétique avec le Fe. Cela explique pourquoi des complexes métallope-Mo ou métallope-V peuvent être cocomitant du fer qui a une constante d'affinité bien plus importante.

### III.2.1 Le Nickel chez *Escherichia coli*

Le nickel est un élément essentiel pour les plantes mais également pour les champignons, les archées, les algues ainsi que les bactéries<sup>61</sup>. Il est impliqué dans de nombreuses enzymes, incluant les hydrogénases, les superoxydes dismutases mais également dans les mécanismes de méthanotrophie<sup>62</sup><sup>63</sup><sup>64</sup>. L'import et l'homéostasie du Ni dans les cellules sont étroitement régulés<sup>64</sup>. Des études détaillées chez *E. coli* ont montré que l'import du Ni pourrait être régulé par un métallopeptide même si la détection n'a pas été faite. Il a été montré que *E. coli* possède un transporteur membranaire de type ABC pour le Ni<sup>65</sup>. Des récepteurs homologues ont été identifiés chez d'autres bactéries. Une protéine membranaire (NikA) est un récepteur au Ni pour le transporteur. Initialement il a été suggéré que ce récepteur interagissait avec des pentaquoionickel<sup>66</sup>. Cependant, des complexes Fe(III)-EDTA se lient fortement sur un des sites de NikA. Ceci suggère que le récepteur peut se lier avec le complexe métal-ligand quaternaire. C'est un indice sur la présence d'un métallopeptide comportant un carboxylate<sup>67</sup>. De plus la spectrométrie de masse montre la présence d'une petite molécule liée au Ni<sup>68</sup>. Le butane-1,2,4-tricarboxylate (BTC) a été proposé comme ligand candidat. Cependant le complexe Ni-BTC- NikA n'a pu être construit. L'hypothétique métallopeptide reste à identifier.

### III.3 Le cobalt chez les bactéries marines et les cyanobactéries

Le cobalt (Co) n'est pas beaucoup utilisé chez les procaryotes. Cependant il est présent dans la cobalamine (B<sub>12</sub>) et il peut se substituer chez d'autres métalloenzymes (par exemple, les anhydrases carboniques). Il pourrait être impliqué dans des voies métaboliques inconnues à ce jour<sup>69</sup>. Plusieurs espèces de cyanobactéries ont besoin du cobalt pour leur croissance<sup>70</sup>. Ce dernier est présent dans les océans et dans la plupart des environnements, en très faible concentration (pM)<sup>71</sup>. Il est donc possible qu'un système d'import utilisant un métallopeptide soit nécessaire, surtout chez les organismes marins.

Cette hypothèse est soutenue par plusieurs indices. L'essentiel du Co dans les océans est chélaté par des ligands à haute affinité<sup>69</sup>. Les cyanobactéries sont connues pour produire en culture des ligands pour le Co. Ces complexes avec le Co sont retrouvés en profondeur dans les océans suggérant qu'ils sont stables. Cependant la structure de ces ligands est inconnue. Une possibilité est que la cobalamine ou ses produits de dégradation soit la source prédominante de ces complexes. Co(III) forme tout de même des complexes très stables avec des bases fortes empêchant d'exclure que d'autres biomolécules ne soient pas candidates<sup>72</sup>. Le cobalt trivalent a la plus grande constante de stabilité connue pour la rhizoferrine (qui comporte un groupe  $\alpha$ -hydroxycarboxylique) ainsi que pour la DFOB ( qui comporte

un groupe trihydroxamates). C'est probablement dû aux liaisons Co-O avec les sidérophores qui sont très courtes<sup>73</sup>. D'autre part plusieurs sidérophores ont montré qu'ils étaient capables de dissoudre plus rapidement CoOOH que FeOOH.

Lorsque l'on regarde le tableau général, ces résultats montrent qu'il est possible que des métallobactines soient impliqués dans l'import du Co chez les procaryotes.

## **Export et import des métallobactines**

### **III.4 Généralités**

Les produits naturels, après avoir été synthétisés sont principalement exportés par différents transporteurs. Pour les bactéries Gram-négatives, ils doivent à la fois passer du cytosol au cytoplasme, puis du périplasme à l'espace extracellulaire. Cela nécessite l'implication de plusieurs mécanismes de concert. Par définition, les bactéries Gram-positives n'ont qu'une membrane puis la paroi à traverser. Forcément les mécanismes impliqués ne sont pas les mêmes (Figure 4).

D'autres, les métallobactines sont une famille fonctionnelle. Les voies de biosynthèses, d'excrétion, d'import ne sont pas les mêmes entre les différents métallobactines. Par conséquent outre les différences entre les Gram-négatives et les Gram-positives, il existe des différences au sein même des métallobactines ayant une affinité préférentielle pour le même métal. Seuls les mécanismes de sécrétions les plus connus, ou ceux ayant une importance pour la compréhension du travail de recherche seront détaillés dans ce chapitre.

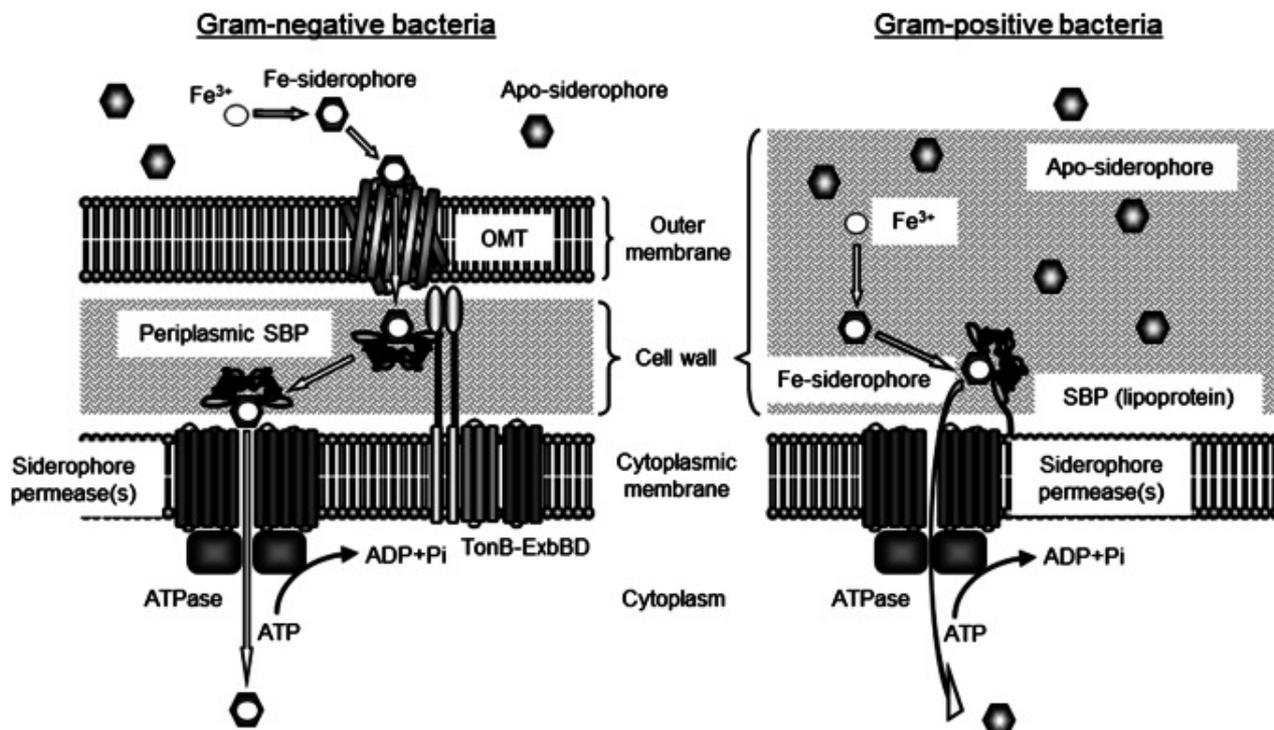


Figure 4 : Les bactéries Gram-négatifs utilisent des transporteurs de la membrane externe (OMT) pour reconnaître les métallobactines liés au métal. Lorsque le substrat est dans le périplasme, un autre système de transporteur permet de transférer le siderophore dans le cytoplasme (ici les « siderophore-binding protein » SBP). Au contraire chez les Gram-positifs, il n’y a pas d’OMT. Une lipoprotéine membranaire reconnaît le complexe et le transfère directement dans le cytoplasme.

## III.5 Les mécanismes d’export et d’import chez les Gram-négatifs

### III.5.1 L’export des métallobactines

Les systèmes d’export des métallobactines ne sont pas homogènes. Plusieurs grands mécanismes existent. Il est important de noter qu’il y a peu de données sur l’export des métallobactines sous forme *apo*. Les deux principales familles de transporteurs sont les protéines « major facilitator superfamily » (MFS) et les protéines « Resistance/nodulation/cell division » (RND). Une troisième famille de transporteurs, les « Multidrug and toxic compound extrusion » MATE pourrait être impliquée. Leur rôle d’exporteurs des métallobactines n’a pas été démontré. Pourtant les MATE pourraient être impliqués dans le transport des chalcophores<sup>46</sup>. La complexité et la diversité de ces mécanismes vont bien au-delà des travaux de cette thèse. D’avantage de précisions n’apporteront pas d’intérêt pour la compréhension des travaux sur la recherche de nouvelles méthnobactines.

Le siderophore est sécrété par la bactérie à l’aide de différentes pompes à efflux que l’on peut ranger

dans trois superfamilles : les « major facilitator superfamily » (MFS), les « Resistance/nodulation/cell division » (RND) et les ATP-binding cassette (ABC).

Par exemple, le transporteur RND permettant de sécréter la pyoverdine chez *P. aeruginosa* est composé de trois protéines, MexA, MexB et OprK qui forment un complexe sécrétant la pyoverdine dans le périplasme. Tous les membres de la famille RND utilisent l'énergie de la force proton-motrice. Ils vont échanger un proton contre un sidérophore (Figure 5) <sup>47</sup>.

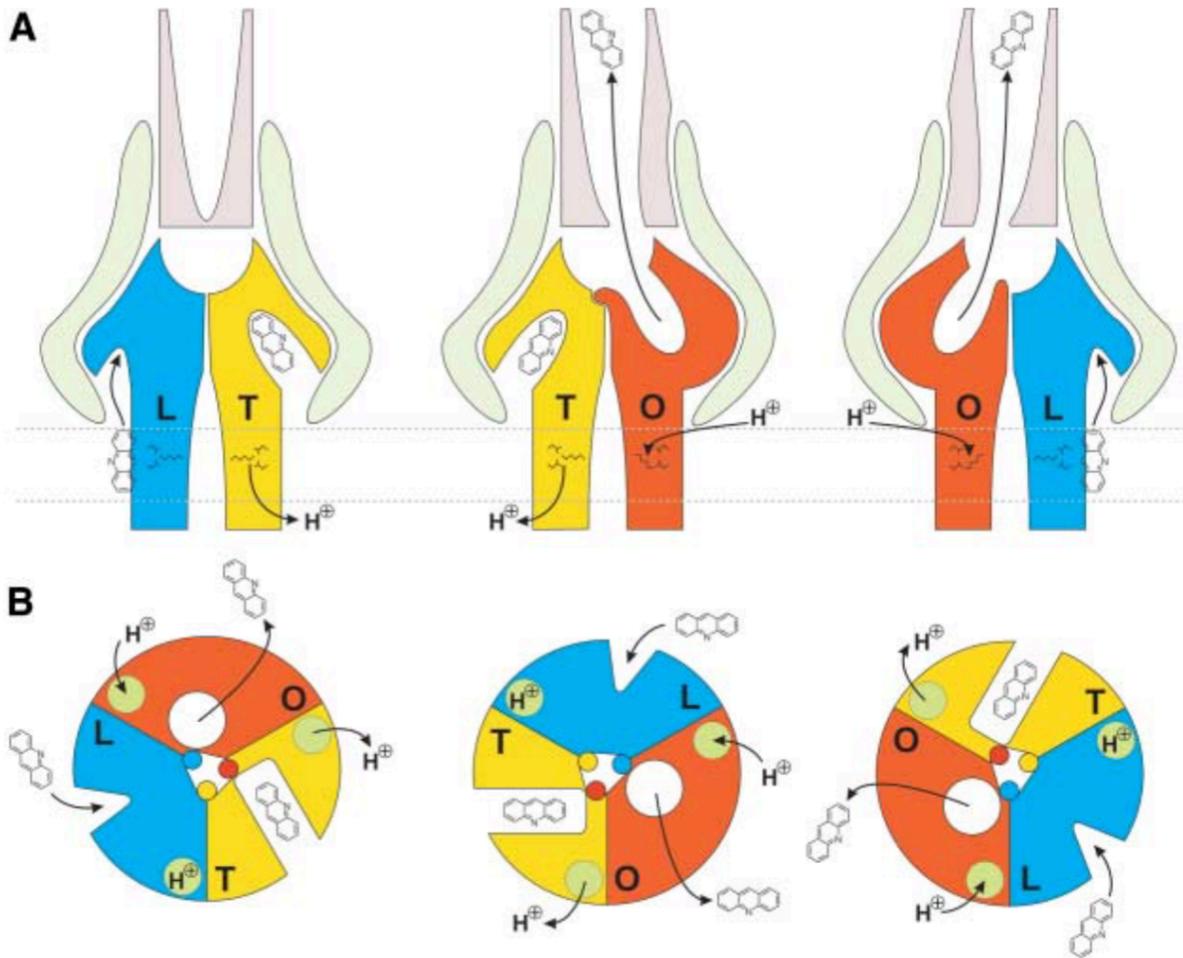


Figure 5 : Représentation schématique d'une pompe RND. Il existe trois états conformationnels différents : loose (L), tight (T) et open (O).

### III.5.2 L'import : Transport actif des complexes métallophore-métal

Les transporteurs TonB dépendant (TBDTs) sont des protéines membranaires bactériennes qui lient et transportent de nombreux sidérophores, complexes de nickel ainsi que la vitamine B<sub>12</sub>. Les substrats varient de simples petites molécules comme les citrates jusqu'aux grosses protéines comme



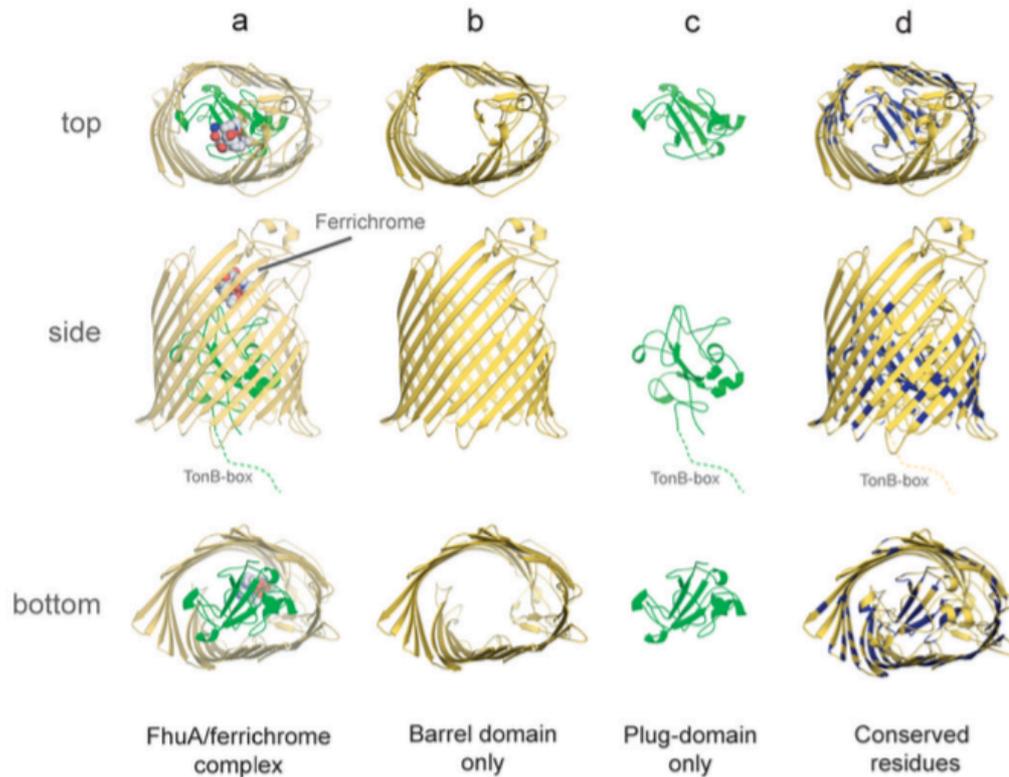


Figure 7 : La structure du TBBD FhuA, transporteur du ferrichrome.

Comme l'import des métaux est vital pour l'essentiel des bactéries, l'expression des TBBDs est régulée par plusieurs voies incluant les régulateurs métal-dépendant, les facteurs  $\sigma$ /anti- $\sigma$ , les petits ARN et même des « riboswitch ».

La biosynthèse des TBBDs est régulée à plusieurs niveaux. Les gènes codants pour les TBBDs de *E.coli* sont répartis dans l'ensemble de son génome. Certains sont transcrits comme des ARN monocistroniques alors que d'autres sont multicistroniques. Dans ces derniers cas, les gènes codant pour les transporteurs ABC sont en aval. L'expression de tous ces gènes est fortement régulée à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Ces contrôles limitent la synthèse des TBBDs lorsqu'ils ne sont pas nécessaires. C'est un mécanisme important car les phages et les colicins (toxines produites par certaines souches d' *E.coli*) peuvent utiliser ces transporteurs pour rentrer dans la cellule

49

Par exemple, la régulation transcriptionnelle de l'import des sidérophores peut se faire par le facteur transcriptionnelle Fur (Ferric Uptake Regulator). Fur se lie à  $Fe^{2+}$ , lorsque ce dernier est en concentration trop élevée. Fur se lie à l'ADN sur le Fur box grâce à  $Fe^{2+}$  qu'il utilise comme

cofacteur. Ceci conduit à l'inhibition de la transcription.

## **IV Valorisation des métallophores**

### **IV.1 Les métallophores et les contaminants métalliques : mobilisation, import et bioremédiation.**

Comme présenté précédemment, un grand nombre de facteurs chimiques, biologiques et environnementaux affectent la chélation et le transport des ions métalliques par les métallophores. Par conséquent la sélectivité « réelle » d'un métallophore pour un métal cible est difficile à évaluer. Ainsi les métallophores peuvent jouer un rôle dans la destinée et le transport de certains métaux qui ne sont pas le métal « physiologique ». Les métallophores ont montré qu'ils étaient capables de chélater de nombreux métaux comme : l'aluminium (Al), l'américium (Am), le bismuth (Bi), le curium (Cm), l'indium (In), le ruthénium (Ru), le plomb (Pb), le platine (Pt), le plutonium (Pu), l'antimoine (Sb), le thorium (Th), l'uranium (U) et bien d'autres terres rares. Ce sont des éléments qui n'ont pas de rôle connu pour la plupart des organismes et qui sont bien souvent toxiques. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que les métallophores pouvaient avoir un rôle dans la dissolution et le transport de ces éléments toxiques présents dans l'environnement. Ils pourraient également avoir un rôle comme agent de bioremédiation dans des systèmes contaminés<sup>82 83 84 85 86</sup>.

Une grande partie du travail dans ce domaine s'est focalisée sur les éléments radioactifs les plus courants. Ce sont des éléments que l'on peut retrouver dans des mines ou des sites de stockage de déchets. Les métallophores peuvent former des complexes forts avec U(IV)<sup>87</sup>, le curium (Cm)<sup>88</sup>, Th(IV)<sup>15</sup>, Pu(IV)<sup>11</sup> et Co(III)<sup>73</sup>. Par exemple pour Pu(IV)HDFOB<sup>2+</sup> et Co(III)HDFOB<sup>+</sup> la stabilité des complexes est meilleure que pour Fe(III)HDFOB<sup>+</sup>. Il a été suggéré que les métallophores pouvaient avoir un intérêt pour le recyclage des matières premières nucléaires<sup>89</sup>. Ils pourraient également servir pour traiter des patients exposés au plutonium et d'autres actinides<sup>90</sup>. La chélation par les métallophores pourrait améliorer la mobilisation des contaminants en améliorant sa solubilité. Ils pourraient également inhiber la sorption des métaux. Ce phénomène a été démontré par l'inhibition de la sorption d'Eu(III) (l'oxyde d'euprium qui est un modèle pour le contaminant radioactif Am(III)) dans la goéthite à l'aide de DFOB<sup>91</sup>. De plus DFOB a montré qu'il était capable de dissoudre Pu, U et Co à partir de minéraux et d'améliorer la désorption de U à partir de la kaolinite et la goéthite<sup>92</sup>. Malgré les évidences de fortes interactions entre les sidérophores et les métaux toxiques dans des conditions de laboratoire, leur rôle dans les conditions naturelles n'est pas certain. C'est dû au manque

d'études sur le terrain dans ce domaine. Ces études sont difficiles à réaliser car dans l'environnement, les métallobactères sont présents en très faible concentration.

Comme les métallobactères peuvent augmenter la solubilité, la biodisponibilité des métaux, ils présentent un grand intérêt pour des applications technologiques et médicales <sup>89 93</sup>.

## V Conclusion Partie I

Les métallobactères regroupent tout un ensemble de molécules, ayant des origines biosynthétiques diverses, des mécanismes de régulations variés, et des mécanismes d'import et d'export différents. Pourtant ils ont tous une même fonction : chélater avec une grande affinité un ion métallique d'intérêt, dans l'environnement extracellulaire pour ensuite le ramener dans la cellule. Les métallobactères sont une famille fonctionnelle.

La structure et les interactions environnementales peuvent faire varier la spécificité des métallobactères. Par exemple les sidérophores peuvent chélater en plus du fer, le cuivre, le cobalt et le vanadium.

Il n'est pas aisé d'évaluer leur importance biologique pour les cellules car les ions métalliques sont impliqués dans de multiples mécanismes. Chaque métallobactère a un rôle unique. La production de plusieurs variétés de sidérophores par une même bactérie est un exemple de la complexité que l'étude des métallobactères peut revêtir.

Pourtant la découverte de nouveaux métallobactères ainsi que la compréhension exhaustive de leur rôle est primordiale. D'un point de vue médical, les sidérophores sont souvent associés aux facteurs de virulence car l'une des défenses de l'hôte est l'immunité nutritionnelle.

La capacité des métallobactères à lier toute une variété de métaux et notamment d'actinides est très intéressante pour la bioremédiation des sites pollués par les déchets nucléaires.

# **Partie II**

## **Les méthanobactines**

# I Le cuivre et les bactéries

Bien que la thématique de cette thèse soit les métallobactéries et plus précisément les chalcophores, il me semble important d'ajouter un chapitre sur le rôle et l'importance du cuivre dans le monde bactérien. Ce chapitre permettra de donner les éléments nécessaires pour replacer dans le contexte l'originalité et l'importance des chalcophores.

## I.1 Rôle du cuivre chez les bactéries

Le cuivre est un oligo-élément important car il est requis comme cofacteur pour certaines enzymes. Cependant le cuivre « libre » est un danger pour les bactéries car il est très réactif. C'est pourquoi les organismes et les cellules régulent très fortement le transport du cuivre. La cellule doit produire des cupoprotéines (métalloenzyme contenant un ou plusieurs atomes de cuivre) pour assurer l'homéostasie et prévenir les effets toxiques de cet élément.

En tant que cofacteur le cuivre va participer à des réactions d'oxydo-reductions comme le transport d'électrons, la respiration oxydative (dans les mitochondries), la dénitrification etc... L'utilisation du cuivre par les organismes vivants est due à l'augmentation de l'oxygène sur terre, il y a 2 milliards d'années. En parallèle, l'utilisation du fer a augmenté car l'équilibre entre  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  s'est déplacé vers les espèces les plus oxygénées. Malheureusement  $Fe^{3+}$  n'est pas très soluble. Par conséquent, l'utilisation du cuivre comme cofacteur a augmenté car  $Cu^{2+}$  (l'espèce la plus oxygénée) est plus soluble, donc plus biodisponible (Figure 8).

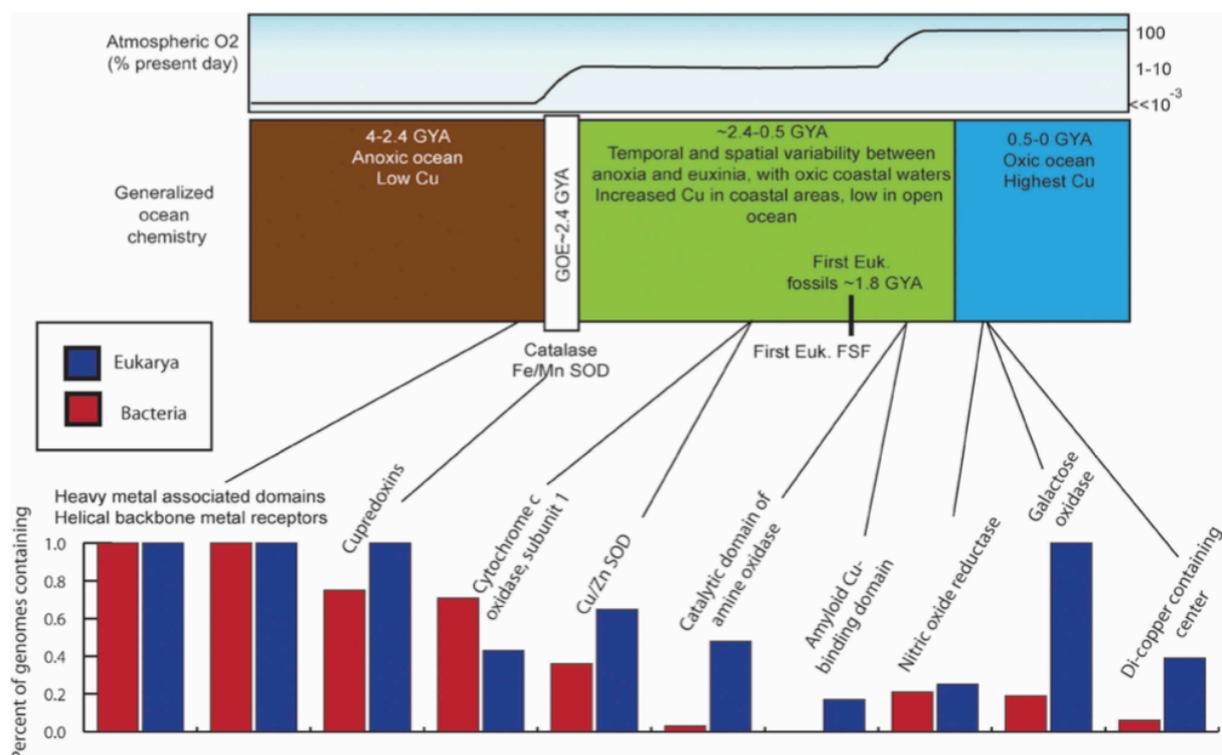


Figure 8 : Evolution de l'utilisation du cuivre à partir de données obtenues par génomique. Il est montré en parallèle l'évolution temporelle de l'oxygène dans l'atmosphère, l'évolution de la biodisponibilité du cuivre et l'évolution des cuproprotéines chez les eucaryotes et les procaryotes.

Peu de cuproenzymes bactériennes sont connues (Table 1). Cependant à l'aide de l'approche de metalloprotéomiques il a été montré que nombre de ces enzymes n'ont pas été identifiées. Les premières analyses suggéraient que les cuproenzymes soient membranaires. Leur mode de sécrétion (système Tat) implique qu'elles récupèrent le cuivre à partir du cytoplasme. A l'opposé, d'autres enzymes sont sécrétées par le système Sec, ce qui signifie qu'elles se replient et lient le cuivre présent dans le périplasme.

Tableau 2 : Liste des cuproprotéines bactériennes connues.

Enzyme	Cu <sup>+</sup> binding sites	Cellular localization	Secretion mechanism	Function
Cytochrome oxidases				
<i>cbb3</i>	1	Inner membrane		Dioxygen reduction
<i>aa<sub>3</sub>, caa<sub>3</sub></i>	2			
Nitrite reductase	2	Inner membrane/ periplasmic	Tat <sup>**</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reduction
Nitric oxide reductase	1	Inner membrane		NO reduction
Nitrous oxide reductase	4	Inner membrane/ periplasmic	Tat <sup>**</sup>	N <sub>2</sub> O reduction
Cu,Zn-Superoxide dismutases	1	Secreted/ periplasmic/ cytoplasmic	Sec <sup>***</sup>	Dismutation of O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Plastocyanin	1	Thylakoid	Sec <sup>***</sup>	Electron transfer
Azurin	1	Periplasmic	Sec <sup>**</sup>	Electron transfer
Laccases	4	Periplasmic	Tat <sup>**</sup>	Phenols and diamines oxidation
CueO	2-4	Periplasmic	Tat <sup>***</sup>	Substrate oxidation
NADH dehydrogenase-2	1	Inner membrane		NADH oxidation
Tyrosinases	1	Secreted	Tat <sup>***</sup>	Monophenol hydroxylation
Particulate methane monooxygenases	2	Membrane		Methane oxidation
Amine oxidases	1	Periplasmic/ secreted	Tat <sup>**</sup>	Oxidative deamination
Polysaccharide oxygenases	1	Secreted	Tat <sup>***</sup>	Cellulose oxidation

*\*References are in the text. \*\*Based on the presence of signal sequences. \*\*\*Based on experimental evidence.*

Par exemple, les oxydases respiratoires « Heme-Cu » constitue une superfamille de cuproenzyme présente dans la majorité des bactéries. Elles sont responsables de la réduction d'O<sub>2</sub> et la génération du gradient de proton H<sup>+</sup> <sup>74</sup>.

## I.2 L'homéostasie du cuivre chez les bactéries

L'homéostasie du cuivre n'est pas bien connue. Ce que l'on sait provient principalement d'*E.coli* qui n'a pas de grandes concentrations de cuivre dans son cytosol : 10<sup>-6</sup> M. Cette valeur est plus importante que la concentration du cuivre extracellulaire (10<sup>-8</sup> M). Etant donné la toxicité du cuivre et les faibles concentrations de Cu(I) requises, l'acquisition du cuivre dans le cytosol n'est pas bien connue. Cette situation est très différente des eucaryotes. De plus, il est probable que l'homéostasie de chaque métal ait une influence sur l'homéostasie des autres métaux.

Au contraire, les mécanismes de défense contre les surcharges de cuivre sont conservés chez presque tous les Gram-négatifs et chez beaucoup de Gram-positifs. La détoxification du cuivre s'effectue par les ATPase de type P qui pompent vers l'extérieur Cu(I) <sup>75</sup>. Le cuivre du périplasma est excrété par une grosse protéine à plusieurs composants comme CusCBA chez *E.coli*. CusA est une protéine « resistance/nodulation/cell division (RND), alimentée par la force proton-motrice. D'un point de vue mécanistique, CusCBA fonctionne comme une pompe péristaltique avec trois conformations

différentes pour les enzymes<sup>76</sup>. Trois méthionines placées dans le cytoplasme sont responsables de la spécificité des liaisons au cuivre.

Un troisième composant est impliqué dans l'homéostasie du cuivre. C'est la multicopper oxydase (MCO). Chez *E.coli*, cette enzyme périplasmique (CueO) oxyde Cu(I) en Cu(II), protège ainsi les protéines périplasmiques de la toxicité de Cu(I)<sup>77</sup>. CueO pourrait aussi oxyder le siderophore entérobactine lui permettant alors de lier le cuivre. Ce mécanisme peut servir à réduire l'apport de cuivre dans le cytoplasme.

### **I.3 Toxicité du cuivre chez les bactéries**

Comme l'oxygène, l'augmentation de la biodisponibilité du cuivre s'est avéré à la fois être une opportunité et un risque pour tous les organismes. En effet comme cofacteur il participe à de nouveaux processus biologiques alors que sous forme ionique libre c'est un poison<sup>78</sup>.

Le cuivre est capable d'attaquer les centres Fer-souffre (Fe-S) de nombreuses protéines intracellulaires, s'il est peu oxygéné (Cu(I)). Lorsqu'il est dans des conditions plus oxiques (Cu(II)), l'ion cuivre est capable de catalyser des réactions « Fenton-like » qui peuvent causer la peroxydation des lipides. Cette capacité du cuivre à infliger des dommages à de nombreuses fonctions cellulaires est utilisée par les macrophages et certaines amibes pour tuer ou digérer les microorganismes. Les eucaryotes à la différence des procaryotes, ont évolué après l'augmentation de la biodisponibilité du cuivre. Ils ont donc de meilleurs mécanismes de transport et de résistance au cuivre. Dans la « course à l'armement » certaines bactéries pathogènes ont également évolué pour acquérir des mécanismes de résistance au cuivre<sup>78</sup>.

Comme montré dans l'article de Macaomber et al en 2009, le cuivre en condition anoxique (Cu(I)) est plus réactif que le cuivre en condition aérobie (Cu(II)). Il peut paraître alors surprenant que les organismes vivants aient une meilleure adaptation pour se protéger de Cu(I) plutôt que de Cu(II).

L'excès de cuivre entraîne l'accumulation de fer et de soufre chez *E.coli* et *Bacillus subtilis*<sup>79</sup>. C'est dû à la diminution de la stabilité des liaisons Fe-S pendant la biosynthèse des protéines. Les gènes codant les enzymes contenant ces liaisons sont induits en cas d'augmentation de la concentration de cuivre. Chez *E. coli* plusieurs enzymes importantes sont inactivées par les ions du cuivre : la dihydroxy-acide déshydratase (IlvD) impliquée dans la biosynthèse des acides aminés « branchés » ; la isopropylmalate déshydratase (LeuC) dans la biosynthèse de la leucine ; la fumarase A (FumA)

dans le cycle des acides tricarboxyliques et la 6-phosphogluconate déshydratase (Edd) dans le cycle des pentoses phosphates. L'inactivation de ces enzymes est létale.

Le cuivre doit donc être maintenu en concentration très faible dans le cytoplasme. Chez *E.coli* les ATPase de type P, régulées par CueR permettent d'obtenir des concentrations très faibles<sup>80</sup>. La plupart des bactéries sont capables de contenir le cuivre dans leur périplasma ou autour de la membrane plasmique. Peu de bactéries ont besoin du cuivre dans leur cytoplasme.

En condition aérobie, le cuivre catalyse des réactions qui produisent des radicaux à travers les réactions de Fenton et de Haber-Weiss ( $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{HO}^- + \text{Cu}^{2+}$ ;  $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Cu}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{Cu}^{2+} + \text{O}_2^{\bullet-}$ )<sup>81</sup>. Ces intermédiaires de l'oxygène sont très réactifs et sont responsables de la peroxydation des lipides, de l'oxydation des protéines et des dommages sur les acides nucléiques.

## II Cuivre, méthanobactines et méthanotrophes

### II.1 Méthanotrophes et méthanobactines

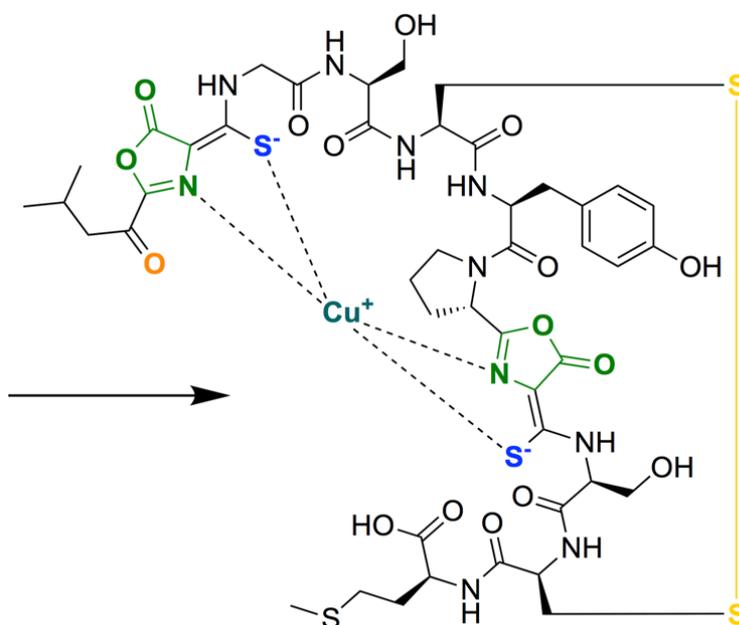


Figure 9 :Méthanobactine OB3b isolée dans le milieu de *M. trichosporium* OB3b

Les bactéries méthanotrophes sont des bactéries gram négatives qui utilisent le méthane comme seule source de carbone et d'énergie<sup>106</sup>. Elles sont responsables de la principale métabolisation du méthane dans la nature. La biotransformation dans la chimie fine, ou encore la capacité à produire de l'énergie

tout en recyclant le méthane ont suscité un intérêt accru chez les scientifiques ces trente dernières années<sup>107, 108</sup>. Les bactéries méthanotrophes oxydent le méthane en méthanol par l'intermédiaire de la « Methane particulate-monooxygenase » (pMMO), une métalloenzyme membranaire dépendante du cuivre<sup>109, 110</sup>. Elle représente jusqu'à 20% des protéines totales de la cellule<sup>111</sup>. Les méthanotrophes ont donc un besoin important en cuivre pour leur métabolisme. Dans un milieu pauvre en cuivre, certains méthanotrophes sont capables de faire un « copper switch » en synthétisant une forme soluble de MMO (sMMO). Ce switch est régulé par les méthanobactines (Mbns), peptides qui chélatent et réduisent le cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$  à  $\text{Cu}^+$ ) avec une grande affinité (constante de dissociation de l'ordre de  $10^{-21} \text{ M}^3$ ). Ces peptides sont le seul exemple de chalcophore, une appellation par analogie aux sidérophores (chalco- vient du mot grec pour cuivre ; sidéro- dérive du mot grec pour fer) dont ils ont une régulation et un transport proches<sup>112</sup>. Les méthanobactines ont été découvertes initialement chez la bactérie méthanotrophe *Methylosinus trichosporium* OB3b<sup>113, 112</sup> (Figure 9).

Les méthanobactines sont des peptides d'une dizaine d'acides aminés (environ 12000 Da), d'origine ribosomique et possédant des modifications post-traductionnelles originales comme des motifs oxazolones, pyrazinediones et thioamides, rarement rencontrés dans les produits naturels. Les méthanobactines connues ont toutes deux hétérocycles dont un noyau oxazolone. Le deuxième hétérocycle, séparé par 2 ou 4 résidus du premier, est variable. Cela peut être une autre oxazolone, une imidazolone ou bien une pyrazinedione. Chaque hétérocycle possède un motif de thioamide adjacent. Ces hétérocycles azotés à cinq atomes et les groupements thioamides sont responsables de la liaison de coordination avec le  $\text{Cu}^+$ . Un arrangement tétraédrique se forme avec les azotes des cycles oxazolones et les soufres des thioamides adjacents<sup>114, 115, 116, 117, 118</sup> (Figure 9).

## II.2 Le système génétique des méthanobactines

Il a été initialement suggéré que la biosynthèse des méthanobactines devait être d'origine non-ribosomale, similaire à celle des sidérophores<sup>119, 120</sup> impliquant les synthétases des peptides non-ribosomiques (Non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs)). Cependant, le séquençage du génome de *M. trichosporium* OB3b en 2010 a permis l'identification d'un cadre de lecture (Open Reading Frame (ORF)) de 30 acides aminés correspondant à la séquence de la méthanobactine produite<sup>121</sup> (*mbnA*). Cela indique que la biogénèse des méthanobactines est issue de la voie ribosomique (voir détails dans la section suivante). Autour de l'ORF, plusieurs gènes ont été identifiés et sont potentiellement impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation de la production des méthanobactines (Figure 10).

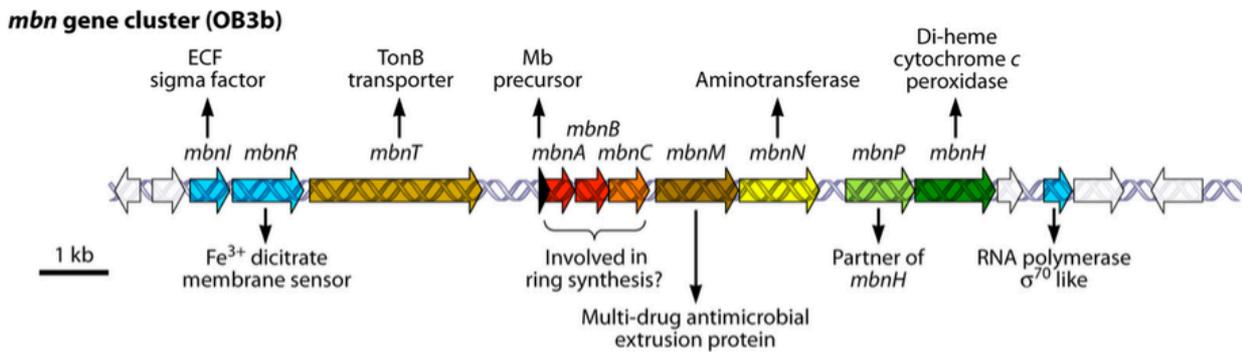


Figure 10 Cluster des gènes de biosynthèse de la méthanobactine OB3b (10 kb) produite par *M.trichosporium OB3b*.

## II.2.1 Export

Le gène *mbnM* code un transporteur MATE (Multidrug and toxin extrusion protein). Ce sont des pompes H<sup>+</sup>/Na dépendant. Chez les procaryotes, ces transporteurs ont pour rôle d'exporter les antibiotiques ou des composés toxiques en échange de cations Na<sup>+</sup> ou H<sup>+</sup>. Les substrats de ces transporteurs sont encore mal connus. MbnM serait probablement responsable de la sécrétion des méthanobactines<sup>122, 123, 124</sup> (Figure 11).

## II.2.2 Import

Le complexe Mbn-Cu<sup>+</sup> est internalisé de façon active via un transporteur de la membrane externe dépendant de TonB (TBDTs)<sup>125</sup>. Les méthanobactines seraient sécrétées sous forme *apo* en cas d'appauvrissement du milieu de la bactérie en cuivre<sup>126, 127</sup>. Une fois complexé avec le cuivre, le complexe peptide-métal serait importé par MbnT utilisant un mécanisme de transport actif<sup>127</sup>. Il est intéressant de noter que les TBDTs jouent le même rôle pour les sidérophores<sup>128, 48</sup> (Figure 11).

## II.2.3 Régulation

Le gène *mbnT* correspondant aux TBDT est précédé par des gènes codant une protéine de senseur membranaire (MbnR) et un facteur sigma ECF (MbnI). Ces assemblages sont souvent observés dans les systèmes FecIRA-like que l'on retrouve chez les sidérophores. Dans ces systèmes, le holo-sidérophore se lie avec le TBDT interagissant avec un senseur membranaire qui interagit avec le facteur ECF pour réguler la transcription des gènes. Un exemple connu de ce système est le FecIRA qui contrôle la transcription des « Iron citrate transporters »<sup>129, 34, 131, 132</sup>. Par analogie, on peut

supposer que ce mécanisme de régulation s'applique aux méthano bactéines chez les méthano trophes (Figure 11).

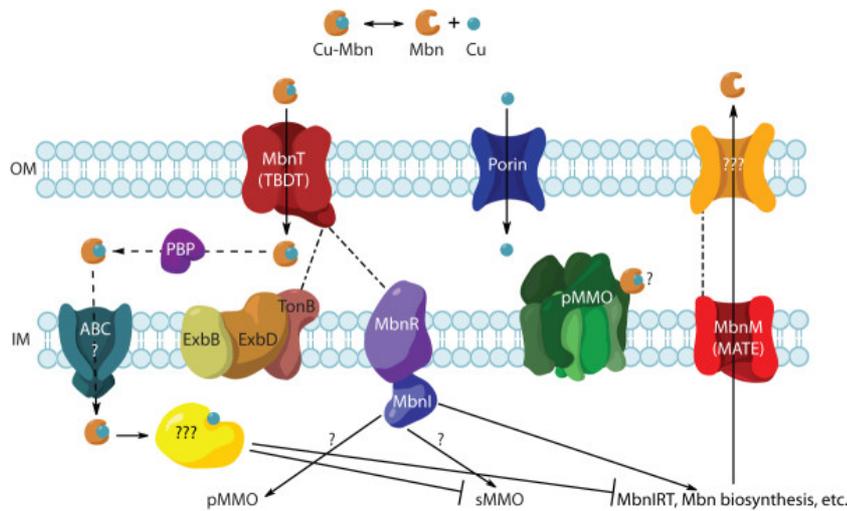


Figure 11 Schéma présentant les hypothèses d'import, d'export et de régulation des méthano bactéines chez les méthano trophes

## II.2.4 Biosynthèse

Les méthano bactéines sont des peptides synthétisés par le ribosome et modifiés post-traductionnellement (RiPPs) <sup>116</sup>.

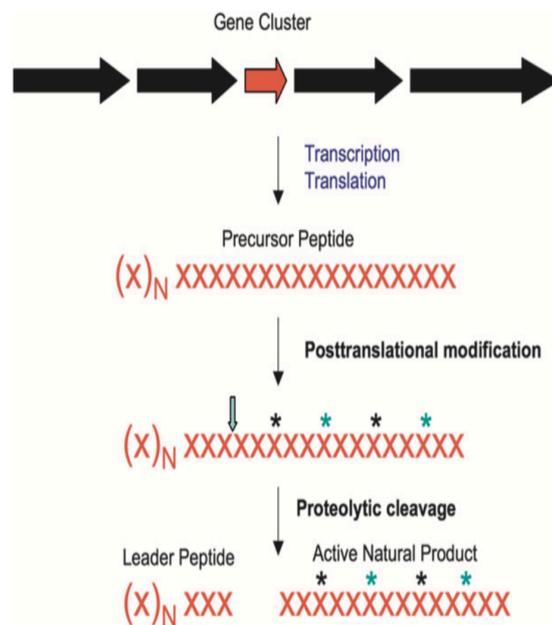


Figure 12 : Schéma général de maturation de RiPPS

La biosynthèse des RiPPS commence par la traduction par le ribosome pour former un précurseur

(Figure 12). Le précurseur contient un peptide leader en N-terminal, qui sert à la reconnaissance des enzymes de maturation, fusionné à une séquence « core peptidique » subissant les modifications. Le peptide leader est coupé par un clivage protéolytique.

Les modifications post-traductionnelles des cystéines sont connues dans la biosynthèse des antibiotiques thiopeptidiques pour former des cycles thiazoles à partir de précurseurs peptidiques produit par le ribosome<sup>133, 134, 135</sup>. Cette cyclisation est régulée par des cyclodehydratases ATP-dépendantes<sup>136</sup>. Ces enzymes convertissent des motifs Gly-Cys et Gly-Ser en noyaux thiazole et oxazole (Figure 5). Une oxydation est ensuite effectuée par une autre enzyme. Les gènes *mbnB* et *mbnC* ne possèdent pas de motifs ou de fonctions connues à ce jour. DiSpirito (2016) estime que *mbnB* et *mbnC* sont impliqués dans une biosynthèse passant par une oxydation et un réarrangement de la séquence du peptide<sup>112</sup>. Des premiers essais menés par le Dr Y. Li et C. Lombart contredisent cette idée. Une réaction *in vitro* a montré que les enzymes MbnB et MbnC en présence du peptide synthétique (MbnA<sub>synth</sub>) induisent une dimérisation de celui-ci avec la perte de molécules d'eau. Un schéma réactionnel est proposé avec la formation d'un intermédiaire thiète. Ce mécanisme est compatible avec l'obtention d'une oxazolone ou d'une pyrazinedione. Ces résultats ont été obtenus avec ou sans ATP. Ces essais suggèrent qu'un nouveau mécanisme de cyclodehydratation ATP-indépendant sur des résidus X-Cys est catalysé par MbnB et MbnC. Les gènes *mbnP* et *mbnH* codent une protéine di-hème cytochrome *c* peroxidase qui pourrait ensuite catalyser l'oxydation finale (Figure 13 et 14).

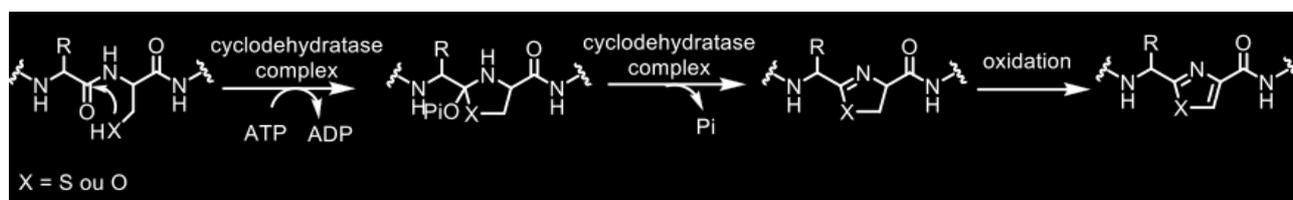


Figure 13 : Mécanisme de cyclisation des oxazolones par des cyclodehydratases ATP-dépendantes chez les thiopeptides.

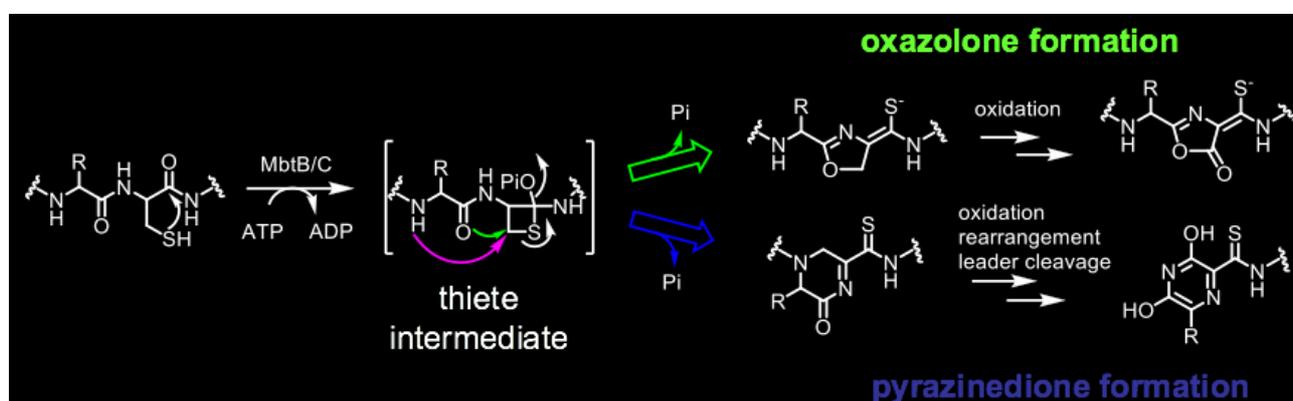


Figure 14 : Hypothèse de cyclisation chez les méthánobactines par des cyclodehydratases ATP-indépendantes.



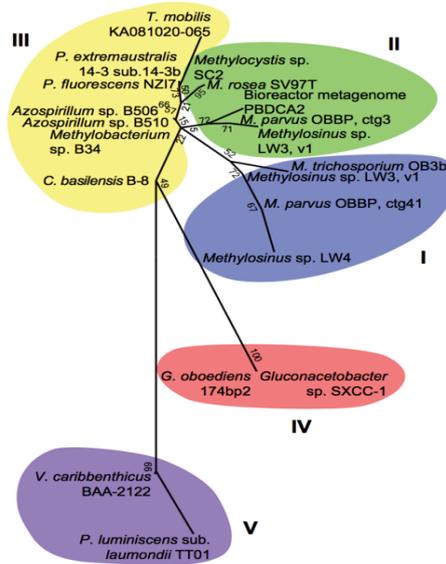


Figure 16 : Arbre Phylogénétique fait à partir de l'alignement des 20 précurseurs Mbna.

### III Application des méthanobactines

#### III.1 Exemple d'une application médicale d'un chalcophore : la méthanobactine OB3b : la maladie de Wilson.

La maladie de Wilson est une maladie génétique autosomique récessive caractérisée par une accumulation toxique de cuivre essentiellement dans le foie et le système nerveux central. Les traitements pharmacologiques actuellement autorisés sur le marché ne permettent pas dans de grands nombres de cas, de restaurer l'homéostasie du cuivre pour des patients ayant déclenché une hépatite fulminante. La seule option reste la transplantation du foie. En 2016 un essai préclinique sur un modèle de rats rapporte l'utilisation d'une méthanobactine, un métallope de type chalcophore. Cet essai ouvre la perspective d'applications médicales pour des métallope différents des sidéropores (les plus connus).

Après un rappel sur la maladie de Wilson, ce chapitre a pour but de présenter les résultats de ces premiers travaux précliniques. Nous ferons le lien entre les travaux de recherche qui seront présentés dans la deuxième partie de cette thèse et l'intérêt médical qu'ils peuvent avoir sur le long terme.

### **III.1.1 Définition et épidémiologie de la maladie de Wilson**

Dans la maladie de Wilson (WD), la perte fonctionnelle de l' « ATPase copper-transporting  $\beta$  » (*ATP7B*) diminue l'excrétion biliaire du cuivre, entraînant une accumulation excessive du cuivre dans le foie et le système nerveux central. Il s'agit d'une maladie rare, puisque l'incidence estimée en France est de 1/30000 à 1/100000 nouveaux cas par an. Sa prévalence est estimée à 1/25 000. La fréquence des hétérozygotes est d'environ 1/90 naissances.

La maladie de Wilson est une maladie génétique autosomique récessive qui résulte d'une mutation du gène d'un transporteur de métaux lourds, l'ATP7B porté par le chromosome 13. La découverte du gène a amélioré les connaissances sur le transport cytosolique du cuivre et ses relations avec la synthèse de la céruléoplasmine. Les patients atteints ont des formes hépatiques, neurologiques ou psychiatriques, et le diagnostic repose sur des arguments cliniques et phénotypiques de présomption, ainsi que sur les anomalies moléculaires associées.

### **III.1.2 Eléments de diagnostics**

#### **III.1.2.1 Manifestations cliniques**

Le début des manifestations cliniques est très rare avant 3 ans, et les signes sont très polymorphes. Le tableau révélateur typique peut être celui d'une hépatite aiguë, parfois sévère, voire fulminante, mais d'autres expressions cliniques sont couramment rencontrées: hépatite chronique ou décompensation oedémato-ascitique révélant une cirrhose méconnue. Les formes hépatiques existent chez 40 % des patients.

Les formes neurologiques s'observent volontiers chez l'adolescent. Le tableau est alors très polymorphe, associant à des degrés variables : tremblement, dysarthrie, dystonie, troubles de l'écriture, troubles de la déglutition. Les symptômes neurologiques sont volontiers accompagnés de troubles psychiatriques en particulier de syndromes dépressifs. Ces formes psychiatriques peuvent être isolées et conduire à des retards diagnostiques importants. Des formes mixtes hépatiques et neurologiques, peuvent aussi exister. Il faut souligner que, lorsqu'il existe une atteinte neurologique, il y a toujours une maladie du foie, sous forme de cirrhose asymptomatique puisque le cuivre se dépose d'abord dans le foie puis ensuite dans le système nerveux central. Des troubles hématologiques à type d'hémolyse, des manifestations rénales (tubulopathies), osseuses (ostéomalacie, ostéoporose, arthropathies), cardiaques (cardiomyopathies et arythmies) peuvent faire

partie de la symptomatologie générale de la maladie. Dans une série importante de patients, les manifestations cliniques initiales étaient : hépatiques (42 % des cas), neurologiques (34 %), psychiatriques (10 %), hématologiques (12 %) et rénales (1 %).

Au niveau oculaire, on observe souvent la présence d'un anneau de Kayser-Fleischer de coloration grise ou dorée qui est la conséquence de dépôts de cuivre en périphérie de la cornée (Figure 17 ). Cet anneau, visualisé grâce à la lampe à fente, est inconstant dans les formes hépatiques ; en revanche, il est constamment présent dans les formes neurologiques.

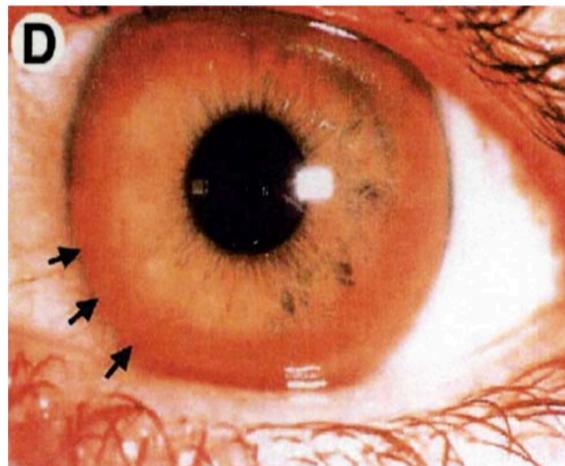


Figure 17 : Anneau de Kayser-Fleischer en périphérie de la cornée.

### III.1.2.2 Données biologiques

Le bilan cuivrique normal et les anomalies observées dans la maladie de Wilson sont regroupés dans le tableau.

#### i. Céruléoplasmine

Le taux de céruléoplasmine est en général abaissé, voire effondré. Le dosage de cette protéine sérique repose en règle générale sur des techniques néphélométriques. Des variations physiologiques des taux de céruléoplasmine peuvent gêner le diagnostic : – augmentation des taux de céruléoplasmine circulante, en cas d'inflammation aiguë, et chez la femme, en cas de thérapeutiques oestrogéniques, de contraception orale ou de grossesse ;

– valeurs basses des taux de céruléoplasmine circulante chez le nouveau-né et le jeune enfant jusqu'à 1 an, souvent inférieures à 0,1 g/L du fait de l'immaturation du métabolisme cuprique chez ces sujets.<sup>6</sup> Un faible pourcentage d'hétérozygotes non malades (environ 10 %) ont également un taux abaissé de

céruleoplasmine de l'ordre de 0,10 g/L.

## ii. Bilan cuivrique

Le cuivre est fixé à 92 % à la céruleoplasmine. En cas de maladie de Wilson, son dosage spécifique peut fournir des éléments d'orientation importants. Des variations parallèles à celles de la céruleoplasmine apportent une confirmation ; un taux élevé avec une céruleoplasmine circulante abaissée doit faire suspecter une augmentation du cuivre libre, stigmate péjoratif de l'affection (Table 3).

Paramètre indispensable au diagnostic, le cuivre urinaire est presque toujours élevé, supérieur à 1,5 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ . Ce dosage est aussi d'un grand intérêt pour suivre l'efficacité et l'observance du traitement.

Le dosage quantitatif du cuivre réalisé sur foie sec à partir d'une biopsie hépatique apporte un élément diagnostique pour des valeurs supérieures à 4  $\mu\text{mol}/\text{g}$  de tissu sec.

Tableau 3: Constantes biologique pour le cuivre chez un sujet normal et un sujet ayant la maladie de Wilson

### Bilan cuivrique

	SUJET NORMAL	SUJETS AYANT LA MALADIE DE WILSON
■ Céruleoplasmine sérum (g/L)	0,2 à 0,4	< 0,1g/L
■ Cuivre total sérum ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	14 à 21	< 10
■ Cuivre libre sérum ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	< 2,1	> 3
■ Cuivre sang total ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	13 à 22	< 10
■ Cuivre urines ( $\mu\text{mol}/24\text{h}$ )	< 0,8	> 2
■ Cuivre foie ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ tissu sec)	0,3 à 0,9	> 4

## iii. Anomalies histologiques hépatiques

À la phase initiale de la maladie, le foie est normal, à l'exception d'une stéatose modérée. À un stade plus avancé, des lésions d'hépatite chronique peuvent être observées et, à une phase encore plus tardive, une cirrhose peut être présente. La stéatose est fréquente dans tous les cas, et il peut exister également des corps de Mallory. Les lésions histologiques ne sont donc pas spécifiques. Les colorations histochimiques du cuivre sont négatives (du fait de leur manque de sensibilité) ou montrent que le cuivre est diffus dans le cytoplasme des hépatocytes.

### III.1.3 Traitements bénéficiant d'une AMM

#### III.1.3.1 Régime

Les apports en cuivre doivent être restreints sans exagération, en privilégiant les aliments pauvres en cuivre. Crustacés, fruits secs, abats, chocolat noir, noix et champignons ne doivent pas être consommés en quantité importante. Le régime n'est pas efficace à lui seul.

#### III.1.3.2 Traitements chélateurs du cuivre

**La D-pénicillamine (Trolovol)** est « l'étalon-or » thérapeutique. Le traitement doit être institué le plus précocement possible, et l'observance doit être parfaite. La D-pénicillamine a des propriétés chélatrices du cuivre bien démontrées in vitro. Il a aussi été suggéré que la D-pénicillamine participe à la détoxification en favorisant la séquestration de cuivre intrahépatique non toxique et la formation de complexes cupriques, ou bien en induisant la synthèse de métallothionéine qui facilite la séquestration de cuivre intraentérocytaire et intrahépatique. Les décompensations très sévères, voire fulminantes, observées à l'arrêt de la D-pénicillamine plaident en faveur de ces hypothèses.

**La Trientine\*** (triéthylène tétramine dihydrochloride) a aussi des propriétés chélatrices du cuivre, en augmentant son excrétion urinaire et en diminuant son absorption intestinale. Les effets secondaires initiaux de la trientine sont une toxicité médullaire et une protéinurie. Des complications plus tardives à type de manifestations autoimmunes peuvent survenir, telles qu'un lupus érythémateux disséminé et un syndrome de Goodpasture. Les effets secondaires sont cependant moins fréquents que ceux liés à la prise de D-pénicillamine; toutefois la trientine n'est indiquée que comme traitement de deuxième intention du fait d'une capacité moindre à éliminer le cuivre par voie urinaire. La dose préconisée est de 1 à 2 g par jour en trois fois avant les repas.

Le traitement par chélateur peut induire une amélioration très nette de la fonction hépatique et des manifestations neurologiques après 3 mois de traitement. En outre, une amélioration très nette de l'atteinte histologique hépatique, avec régression de la fibrose, peut être constatée. Dès qu'une amélioration significative est obtenue et qu'une diminution du cuivre de tout l'organisme est atteinte, les patients peuvent être traités par une dose équivalente de la moitié de la dose initiale en traitement d'entretien.

**Le zinc (Wilzin)\*** a pour principal mode d'action l'induction de métallothionéines qui favorisent la séquestration du cuivre dans les cellules épithéliales intestinales. Le zinc a aussi un effet protecteur sur la cellule hépatique, en induisant la synthèse de métallothionéines hépatiques. La dose habituelle

administrée est de 50 mg trois fois par jour. Les effets secondaires sont essentiellement des maux de tête et des douleurs abdominales. Le zinc n'est pas utilisé en première intention ; son administration est réservée aux formes résistantes aux autres chélateurs décrits précédemment ou aux patients intolérants à ces chélateurs.

### **III.1.3.3 Recherche pour de nouveaux traitements.**

Lorsque l'hépatite fulminante est déclenchée, la plupart du temps à cause d'un retard de diagnostic, un échappement thérapeutique, la mort du patient est inévitable à moins qu'une transplantation hépatique soit réalisée. Une mauvaise tolérance des traitements thérapeutiques est également souvent la cause de décès de patient atteints de la maladie de Wilson <sup>94</sup>. Tous les traitements chélateur du cuivre approuvé actuellement par la FDA et la EMA ont des effets indésirables : toxicité pour la moelle épinière, néphrotoxicité, hépatotoxicité, anémie. De plus ces traitements déclenchent souvent des maladies auto-immunes<sup>95 96 97</sup>. A cause de la toxicité de la D-PA l'arrêt du traitement est obligatoire dans presque un tiers des patients <sup>96</sup>.

Il y a un besoin important de nouveaux traitements innovant pour la maladie de Wilson. Trois études méritent une attention particulière. En premier, des essais pour une thérapie génétique à l'aide de vecteurs adéno-associés (rAAV) construits pour permettre une expression spécifique au foie du gène ATP7B. Le but est de produire un traitement curatif sur le long terme. Cependant l'expression transgénique du vecteur est lente. Ce traitement ne peut pas être utilisé en urgence dans le cas d'une hépatite fulminante <sup>98</sup>. Une deuxième étude rapporte l'utilisation d'un décapeptide OSIP108 dérivé d'une plante. Ce peptide protège la mort cellulaire induite par le cuivre, de levure et cellules humaines HepG2. De façon surprenante l'effet positif n'est pas dû à la réduction de la quantité de cuivre intracellulaire mais son effet sur l'homéostasie des sphingolipides <sup>99</sup>. En effet le cuivre est connu pour induire une activité sphingolipidase sur la lignée HepG2. La présence de OSUP108 permet d'inhiber cet effet délétère. Une troisième étude porte sur l'utilisation de glycopeptides avec un motif « thiol » pour chélater de façon spécifique le cuivre contenu dans les cellules hépatiques <sup>100</sup>. Malgré ces nouvelles voies de recherches prometteuses, il n'y a pas d'avancée pour des traitements d'urgence dans le cas d'hépatites fulminante induite par la maladie de Wilson.

### III.1.3.4 Utilisation d'une méthnobactine pour traiter l'hépatite fulminante induite par WD chez le rat.

En 2016, dans « The Journal of Clinical Investigation » J. Lichtmanegger et al rapporte l'utilisation de la méthnobactine OB3b (MB) pour traiter des hépatites fulminantes sur des modèles de rats qui accumulent le cuivre au niveau hépatique (rats LPP *Atp7b*<sup>-/-</sup>) conduisant à des hépatites fulminantes. Une description plus exhaustive de la méthnobactine est faite dans la seconde partie de cette thèse. Pour l'instant il est important de savoir que la méthnobactine est un peptide modifié de façon post traductionnelle. C'est un métallopeptide de type chalcophore qui a donc une grande affinité pour le cuivre.

L'essai préclinique s'est fait par comparaison avec les traitements cliniques pour la maladie de Wilson approuvés par la FDA et l'EMA : D-pénicillamine (D-PA) et la triéthylène tétramine dihydrochloride (TETA). L'étude porte à la fois sur des essais *in vivo* et *in vitro*

*In vivo*. Seul la méthnobactine a démontré une efficacité contre une hépatite fulminante sur les rats LPP *Atp7b*<sup>-/-</sup>. Les rats LPP *Atp7b*<sup>-/-</sup> (accumulant le cuivre) ont été traités quotidiennement pendant 3 ou 5 jours ou pendant 8 jours consécutifs avec une injection intrapéritonéale avec une dose de 150 mg/Kg. Les traitements référents à savoir la D-PA, ou le TETA ont été ajoutés dans l'eau de façon à obtenir des doses respectivement de 100 mg/kg et 480 mg/kg. Ces doses et modes d'administration ont déjà étaient utilisés avec succès pour prévenir des hépatites fulminantes chez des rats LEC ( un autre modèle de rats pour WD) <sup>101</sup>. La méthnobactine (MB) permet une diminution rapide du cuivre accumulé au niveau mitochondriale. Cet effet se retrouve aussi bien sur le modèle de rat *Atp7b*<sup>-/-</sup> que sur des rats WT artificiellement chargé en cuivre (Figure 18A). Cet effet n'est pas retrouvé avec les chélateurs du cuivre D-PA et TETA. TTM semble tout de même permettre une réduction de la charge en cuivre dans une moindre mesure.

Les auteurs ont également d'évaluer la capacité de MB à sauver des rats *Atp7b*<sup>-/-</sup> ayant déclenchés une hépatite fulminante. Ce traitement d'urgence était composé de deux injections quotidienne de MB pendant une semaine. Quatre rats *Atp7b*<sup>-/-</sup> avec des taux d'aspartate aminotransférase (AST, un marqueur de l'inflammation du foie) très élevés ont été traités. Tous les animaux ont survécu et ont fini par récupérer une fonction hépatique normale. Il est dommage qu'il n'y ait pas eu d'animaux témoins, traités avec les médicaments de référence.

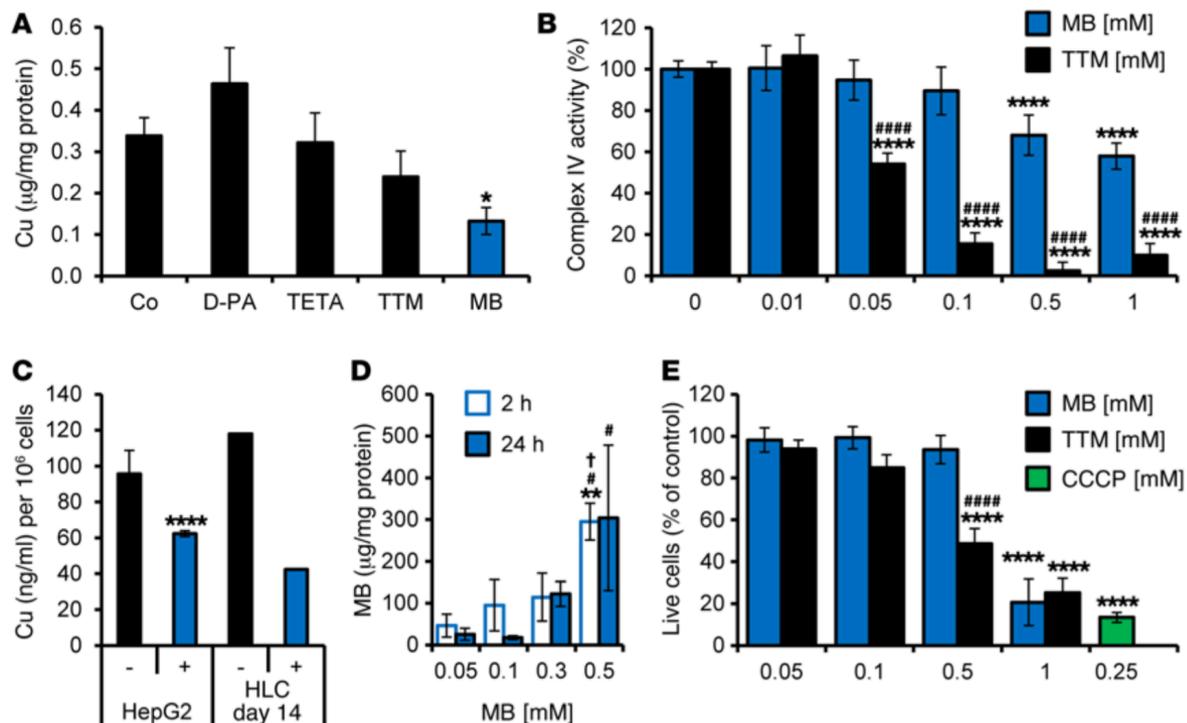


Figure 18 : La méthanobactine diminue la quantité de cuivre dans les mitochondries des cellules du foie. A) Extraction du cuivre à partir des mitochondries du foie. B) Toxicité du cuivre sur le complexe IV des mitochondries. C) Cellules chargée artificiellement avec du cuivre. D) Import dose dépendant de méthanobactine à 2 et 24h. E) HepG2 traitée avec MB ( 500 µM).

*In vitro*. Au niveau cellulaire, après une incubation d'une nuit, MB réduit significativement la charge de cuivre sur des cellules HepG2 artificiellement chargée en cuivre sans pour autant montré de toxicité. Depuis, pour évaluer l'efficacité de MB sur des échantillons de patient atteints de WD, les auteurs de l'étude ont reprogrammé des cellules urinaires épithéliales en cellules hépatocytes-like (IPSCs). Sur ces lignées cellulaires, des réductions de charge en cuivre similaire aux résultats sur Hep62 ont été observés (Figure 18C).

A l'aide d'un anticorps spécifique anti MB, les auteurs ont montré que MB était importé dans les cellules HepG2 de façon dose dépendante (Figure 18D). La cytotoxicité de MB n'apparaît que pour des concentrations de l'ordre du mili-molaire (Figure 18E). Il ne semble pas qu'il y ait de toxicité de la part des MB à leur concentration d'efficacité. De plus, par comparaison à TTM, MB est moins toxique comme le montre l'activité du complexe mitochondriale IV, cuivre dépendant indispensable à la survie de la cellule.

Pour conclure, cette étude montre que les méthanobactines peuvent être une réelle opportunité thérapeutique pour traiter WS, notamment dans le cas d'hépatites fulminantes pour lesquelles il n'existe pas de traitement actuellement. La prochaine étape sont des essais sur des patients. L'utilisation de metallophores chez l'homme n'est pas sans précédent. Par exemple, un sidérophore

bactérien, la déferoxamine provenant de *Streptomyces pilosus* a été utilisé pour soigner des intoxications au fer ou des hémochromatoses<sup>102</sup>. La méthanobactine paraît être un bon « leader » pour développer de nouveaux médicaments, plus efficaces et plus sûrs pour la maladie de Wilson.

### **III.2 Application biotechnologique d'une méthanobactine.**

L'utilisation la plus connue et aboutie des méthanobactines en tant que catalyseur est dans la « synthèse verte » de nanoparticules d'or (AuNPs) à l'aide de méthanobactines isolées du milieu *de Méthylosinus trichosorium 3011*. Les méthanobactines peuvent chélater et réduire Au (III) en Au (0)<sup>103</sup>. La réduction continue de Au (III) est réalisée en utilisant de l'hydroquinone comme agent réducteur. Les nanoparticules d'or sont monodispersées et stables. Les méthanobactines s'adsorbent sur la surface de la nanoparticule d'or pour former un complexe Mbns-gold. Cela permet d'éviter une nucléation secondaire. Les nanoparticules d'or ont une application en cancérologie via la photothermie. Cela consiste à détruire des cellules cancéreuses par irradiation. La technique repose sur un but précis : faire osciller la particule d'or en utilisant l'infrarouge. *In fine* cette oscillation va permettre un dégagement de chaleur qui est fatal à la cellule cancéreuse.

## IV Les travaux de recherche au sein du MDCEM

### IV.1 Le modèle d'étude en laboratoire

Le laboratoire d'accueil mène actuellement une étude intégrée dont le but est de découvrir et de comprendre la chimio-diversité et le rôle écologique des peptides de type méthanobactines chez les non-méthanotropes. Le modèle d'étude est le peptide apparenté à la méthanobactine chez *Pseudomonas extremaustralis* (Mbn\_Pex), qui fait partie du groupe III. *P. extremaustralis*, est une bactérie gram-négative isolée d'une mare temporaire en antarctique<sup>137</sup>. Elle possède une physiologie singulière : adaptation au grand froid ; grande résistance au stress oxydatif et métabolisme microaérobie. Cependant, elle pousse également à 30 °C sur un milieu standard<sup>138</sup>. *P. extremaustralis* est donc un bon modèle de laboratoire pour l'étude du rôle physiologique de la méthanobactine.

Le cluster de la méthanobactine-like de *P. extremaustralis* (mbn\_Pxe) est proche de celui de *M. trichosporium* (Figure 19). Les gènes à fonction inconnue *mbnB* et *mbnC* et les gènes de transport *mbnT* et *mbnM* sont conservés. Les travaux en cours au laboratoire n'ont pas permis d'identifier Mbn\_Pex dans le milieu de culture de *P. extremaustralis* malgré l'obtention de différents mutants. Il est probable que la bactérie produise le peptide dans des conditions particulières que l'on ne pourra pas reproduire en laboratoire. Différentes stratégies existent pour exprimer des clusters de gènes silencieux.

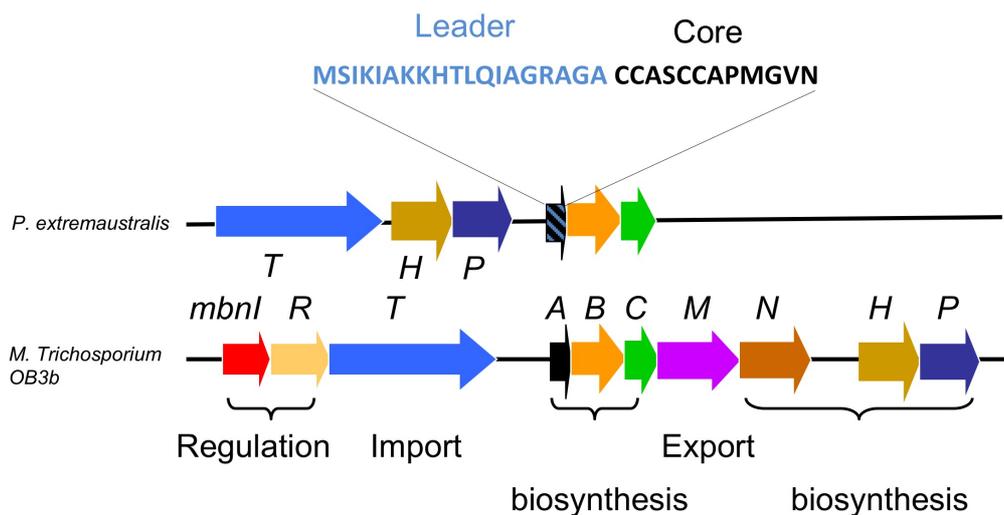


Figure 19 : Comparaison des clusters des méthanobactines OB3b et Mbn\_Pex.

## IV.2 Genome mining et expression hétérologue

L'avènement de la génomique et du séquençage nouvelle génération (NGS) ont mis en évidence des microorganismes ayant le potentiel de produire de nombreux métabolites qui n'ont pas été détectés en conditions de laboratoire<sup>139</sup>. Comme le montre la figure 21, à partir du génome séquencé d'une bactérie, différents algorithmes (par exemple antiSMASH<sup>140</sup>) vont être utilisés pour identifier des gènes cryptiques ayant le potentiel de produire des nouveaux composés. Ce processus d'exploration des génomes se nomme le « genome mining ». La biologie moléculaire va permettre d'utiliser de nombreuses stratégies pour découvrir ces composés<sup>139</sup>.

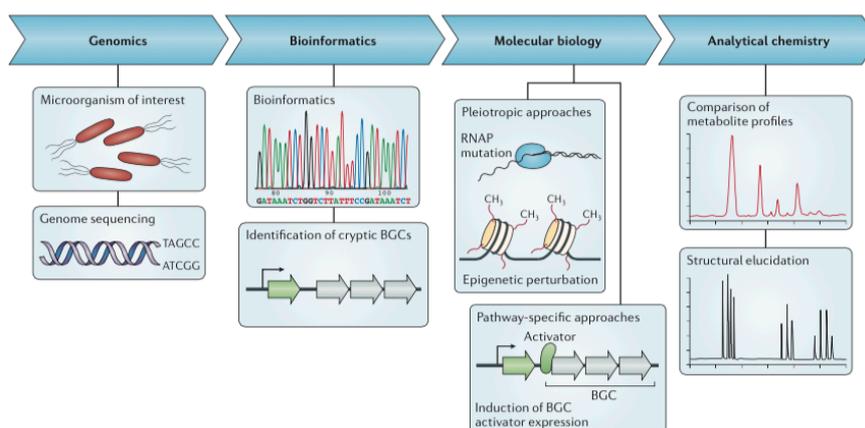


Figure 21 : Découverte de nouveaux composés naturels par « genome mining ».

Parmi elles, l'expression hétérologue d'une voie de biosynthèse microbienne a fait ses preuves<sup>141</sup>.

Cela consiste à exprimer des gènes, une partie d'un cluster ou bien tout un cluster entier dans un hôte différent de celui d'origine (Figure 19). Les hôtes hétérologues présentent souvent des avantages par rapport aux souches d'origine, comme être plus accessibles pour la manipulation génétique ou être cultivés plus facilement. Cela permet de simplifier l'identification d'un composé en supprimant le mécanisme de régulation complexe existant dans l'hôte d'origine. Récemment, les avancées en biologie synthétique permettent de cloner et manipuler plus facilement les clusters de gènes de grande taille<sup>141</sup>. La stratégie générale consiste à construire un plasmide contenant le cluster, puis à introduire le cluster dans une souche d'expression adéquat. La mobilisation de l'ADN

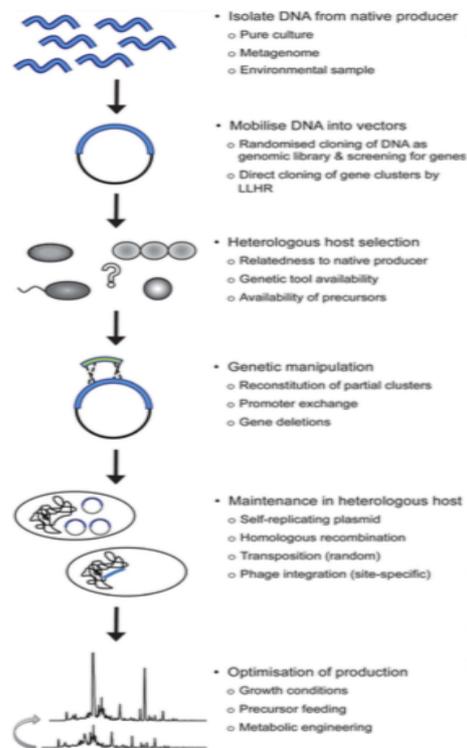


Figure 20 : Principe général de l'expression hétérologue.

sur un plasmide permet d'effectuer facilement des manipulations génétiques. L'ensemble de ces outils génétiques font de l'expression hétérologue une méthode de choix pour élucider les voies de biosynthèses à partir d'un cluster. L'expression hétérologue est un moyen efficace de découvrir des composés naturels produits par des clusters de gènes qui n'ont pu être caractérisés ou qui ne s'expriment pas ou peu en conditions de laboratoire. De nombreux produits naturels ont été découverts via l'expression hétérologue. Par exemple, le thiopeptide GE2270 provenant de *Planobispora rosea* a été exprimé chez *Streptomyces coelicolor* en 2014<sup>142</sup>. Plusieurs variables sont à prendre en compte telles que l'utilisation d'un vecteur stable, la sélection d'un hôte adéquate ou encore la composition des milieux de cultures<sup>141</sup>. Il est difficile de prédire le succès d'une expression hétérologue. Certaines enzymes s'expriment facilement alors que d'autres nécessitent beaucoup d'étapes d'optimisation. Il est également possible d'obtenir de très bonnes concentrations<sup>143, 144, 145</sup>.

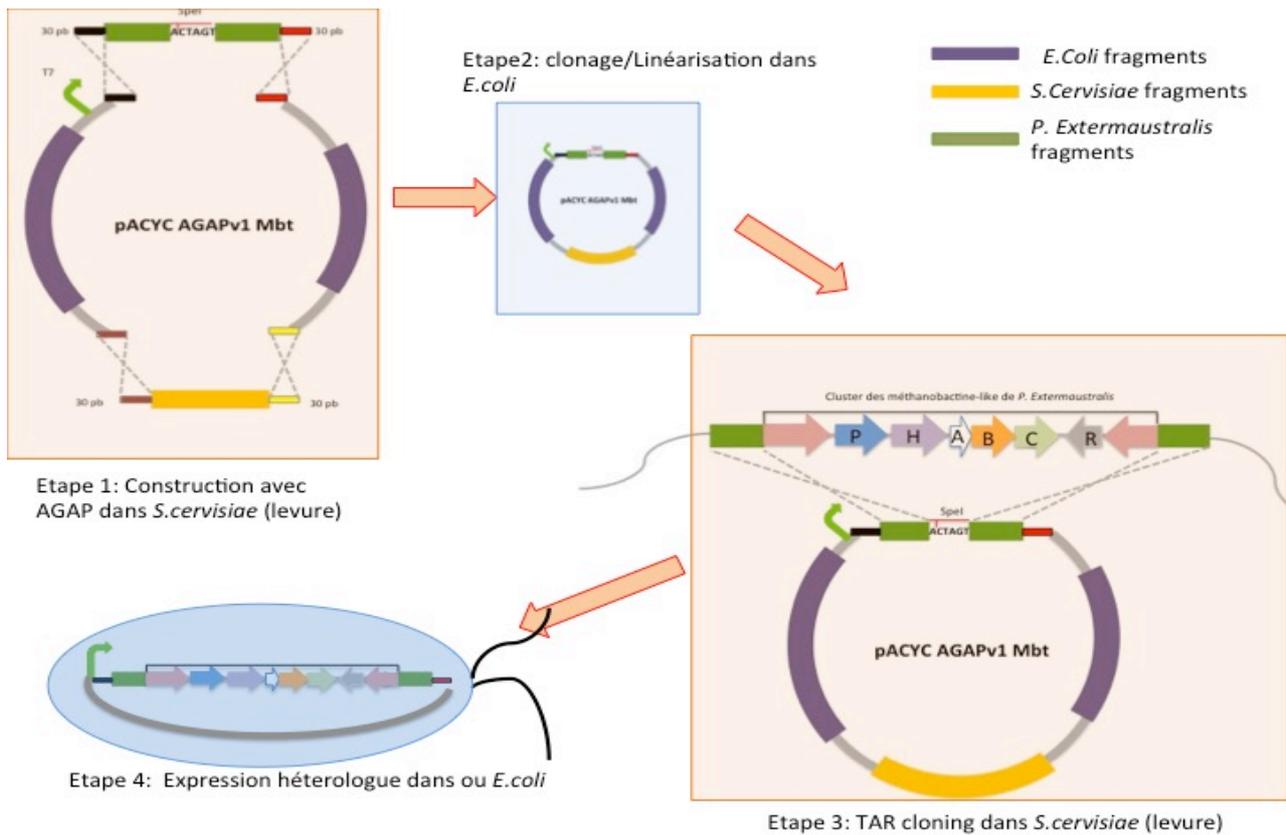
## **IV.3 Objectifs**

L'objectif de mon stage était de construire un système d'expression hétérologue du cluster de la méthanobactine de *P. extremaustralis* chez *Escherichia coli*. Exprimer dans un hôte hétérologue ce cluster permet de s'affranchir de la régulation native, probablement complexe qui empêche Mbt\_Pxe de s'exprimer dans des conditions de laboratoire. D'autre part, mobiliser ce cluster dans un plasmide que l'on maintient dans *E. coli* permet l'utilisation de nombreux outils génétiques pour générer des variants rapidement. On peut de cette façon étudier la biosynthèse plus facilement que dans la souche native.

### **IV.3.1 Stratégie de construction du système d'expression hétérologue**

#### **IV.3.1.1 TAR clonage**

Pour construire ce système d'expression hétérologue nous avons besoin de techniques innovantes. L'essor des techniques de recombinaison chez la levure a permis de développer des méthodes simples et efficaces pour le clonage des fragments d'ADN de grande taille. Le clonage TAR (Transformation-Associated Recombination) permet de capturer en une étape un fragment d'ADN génomique spécifique pouvant atteindre 250 kb<sup>146</sup>(Figure 22). Cette capture se fait chez *Saccharomyces cerevisiae* qui est capable de recombiner des éléments homologues avec une grande



**Figure 22 : Principales étapes du clonage TAR effectué lors de ce stage.**

efficacité par rapport à *E.coli*. A l'origine, cette méthode a été utilisée pour capturer et exprimer des grands clusters de gènes biosynthétiques à partir d'ADN de l'environnement ou pour capturer des télomères<sup>147</sup>. Yamanaka et al en 2014 ont adapté cette méthode pour capturer des clusters de gènes silencieux de plus de 60 kb chez des actinomycètes<sup>148</sup>. Pour capturer le cluster il faut au préalable construire un vecteur de capture qui possède des bras de capture de 1kb homologues à des régions encadrant le cluster cible. Une fois que le cluster est inséré dans le plasmide, celui-ci est transformé dans une souche de clonage *E.coli*. Après multiplication et/ou manipulation, le vecteur peut être transformé dans une souche d'expression.

Cette technique n'a jamais été utilisée par un membre de l'équipe et a nécessité un temps d'apprentissage et d'optimisation important. Néanmoins le cluster de la méthanobactine-like est un bon exemple pour éprouver cette méthode de par sa taille (10 kb) et la facilité de culture de *P. extremaustralis* permettant d'obtenir de grandes quantités d'ADNg

### IV.3.1.2 Méthode AGAP

Pour construire le vecteur de capture nous utilisons la méthode AGAP (Any-gene-any plasmid)<sup>149</sup>. L'assemblage s'effectue en une seule étape par recombinaison homologue dans *S. cerevisiae* en utilisant la méthode AGAP (any-gene-any-plasmid). Chaque brin doit partager entre 15 et 40 nucléotides homologues. Le vecteur de capture a besoin d'être un vecteur navette entre *E. coli* et *S. cerevisiae*. Il doit posséder une origine de réplication chez *E. coli* (par exemple p15a) ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique (par exemple Cm<sup>R</sup>). Il faut l'équivalent chez *S. cerevisiae*. L'origine de réplication 2  $\mu$ ori permet de maintenir un nombre de copies élevées de plasmides chez la levure. La sélection chez la levure se fait sur un milieu dépourvu d'un acide aminé ou d'une base nucléotidique pour lesquels la levure est rendue auxotrophe par inactivation ou délétion d'un gène (comme l'uracile). Il faut également que le vecteur comporte les éléments nécessaires à l'expression du cluster dans l'hôte. Chez *E. coli* cela peut être un promoteur fort T7 avec le RBS (Ribosome Biding Site).

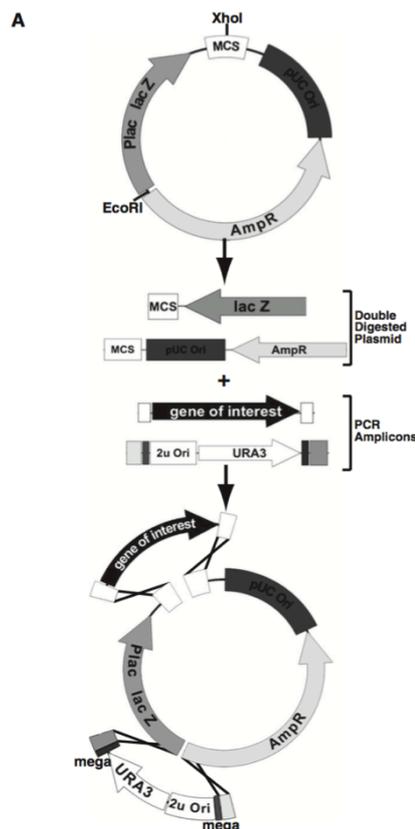


Figure 29 : Principe de la méthode AGAP de Joska et al 2014

### IV.3.1.3 Construction d'un système d'expression hétérologue par recombinaison homologue du cluster natif

La première stratégie en cas d'échec du TAR cloning est d'utiliser la recombinaison homologue AGAP à partir de fragments PCR du cluster. Le cluster d'intérêt étant de taille modeste (10 kb), nous pouvons extraire plusieurs parties par PCR. Il faut rajouter des séquences homologues de 30 pb à chaque extrémité du cluster. Cela permet d'assembler en une étape le cluster avec le vecteur d'expression comme vu précédemment (Figure 23).

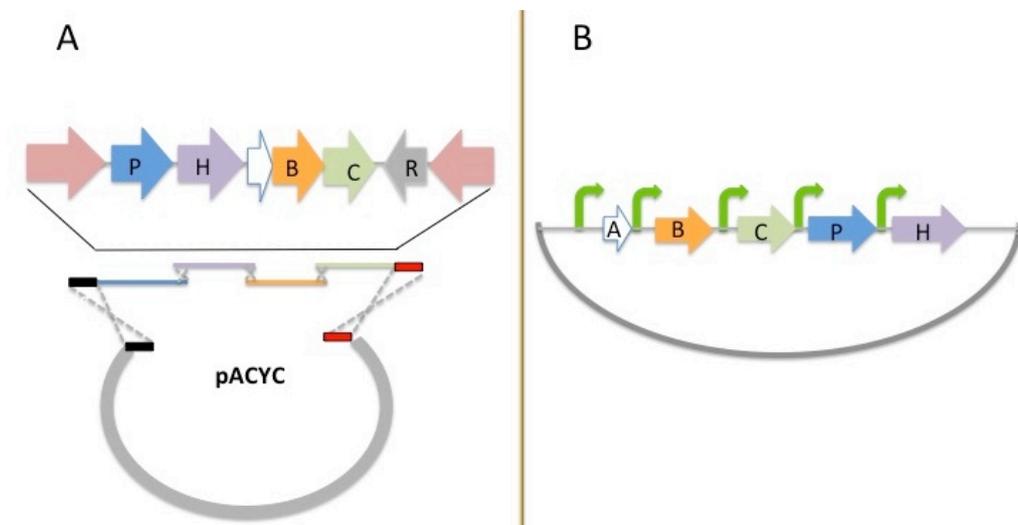


Figure 22 :A/Clonage par recombinaison homologue du cluster natif en utilisant la méthode AGAP. B/ Clonage à l'aide d'enzymes de restrictions. Chaque gène d'intérêt est cloné sous contrôle d'un promoteur fort T7.

### IV.3.1.4 Construction d'un système d'expression hétérologue par clonage à l'aide d'enzymes de restrictions.

La deuxième stratégie consiste à cloner chaque gène séparément. Les cinq gènes seront assemblés dans un seul plasmide à l'aide de sites d'enzymes de restriction ajoutés dans les amorces de PCR. Chaque gène est placé sous le contrôle d'un promoteur T7 en le clonant dans un premier temps dans un vecteur de clonage pET puis en amplifiant le promoteur et le gène à nouveau afin de les introduire dans le vecteur d'expression (Figure 23).

## V Matériel et méthodes

### V.1 Réactifs chimiques et biologiques

Tous les réactifs chimiques proviennent de Sigma-Aldrich ou de Carl Roth (sauf mention contraire). De même, tous les réactifs de biologie moléculaire viennent de Thermo Fisher (Fermentas). Les souches bactériennes, les antibiotiques et les plasmides sont listés dans les tableaux 3 et 4. Les amorces de PCR ont été construites avec Geneious 8.0.5 et sont consignées dans l'annexe n°5. Si le contraire n'est pas précisé ces amorces ont été choisies selon les paramètres suivants : une longueur de 17-22 pb, une température de fusion à 56-64°C, et un pourcentage de GC entre 55-65 %. Les antibiotiques utilisés étaient kanamycine (Km) à 50 µg/mL et chloramphenicol (Cm) à 35 µg/mL. Les milieux sont précisés dans la table 3.

Table 3 Liste des plasmides

Plasmide	Description	Source
pACYCDuet-1	Deux promoteurs T7, origine p15a (low copy number), <i>lacI</i> et Cm <sup>R</sup>	Novagen
pCOLADuet-1	Deux promoteurs T7, origine ColA ori (high copy number), <i>lacI</i> et Km <sup>R</sup>	Novagen
pET-28b(+)	Un promoteur T7, origine f1 (medium copy number), <i>lacI</i> et Km <sup>R</sup>	Novagen
pACYC_ <i>mbnA</i>	Le gène <i>mbnA</i> cloné entre site <i>EcoRI</i> et <i>HindIII</i>	Construit au laboratoire
pET28- <i>mbnB</i>	Le gène <i>mbnB</i> cloné entre site <i>NdeI</i> et <i>XhoI</i>	Construit au laboratoire
pET28- <i>mbnC</i>	Le gène <i>mbnC</i> cloné entre site <i>NdeI</i> et <i>XhoI</i>	Construit au laboratoire
pRS426-ADH	Vecteur d'expression chez la levure ; matrix pour amplifier YCC ( <i>ura3</i> et 2µori)	Don de l'INRA
pACYC AGAPv1	Deux promoteurs T7, bras d'homologie UP et DN sous contrôle de T7, <i>lacI</i> et Cm <sup>R</sup> , cassette YCC ( <i>ura3</i> et 2µori)	Ce travail
pACYC AGAPv1- <i>mbn</i>	Deux promoteurs T7, bras d'homologie UP et DN sous contrôle de T7, <i>lacI</i> et Cm <sup>R</sup> , cassette YCC ( <i>ura3</i> et 2µori), cluster de la méthanobactine <i>mbn_Pex</i>	Ce travail
pACYC AGAPs3	Deux promoteurs T7, bras d'homologie UP et DN sous contrôle de T7, <i>lacI</i> et Cm <sup>R</sup> , 2µori, <i>ura3</i> entre UP et DN	Ce travail
pCOLA T7w-mbtA	Deux promoteurs T7, origine ColA ori (high copy number), <i>lacI</i> et Km <sup>R</sup> , <i>mbnA</i> dans <i>SacI</i> et <i>NotI</i>	Ce travail
pET28- <i>mbnP</i>	Le gène <i>mbnP</i> inséré entre site <i>NdeI</i> et <i>XhoI</i>	Ce travail

**Table 4 Listes des souches bactériennes avec les milieux utilisés dans cette étude.**

Souches	Description	Source	Milieu
<i>S. cerevisiae</i> VL6-48/ATCC MYA-3666	MAT alpha, <i>his3</i> -D200, <i>trp1</i> -D1, <i>ura3</i> -52, <i>lys2</i> , <i>ade2</i> -101, <i>met14</i> , <i>psi+cir0</i> ; Souches pour la capture directe	ATCC	YPD/Dropout media from Sunrise
<i>S.cerevisiae</i> BY4742	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 ; souche pour le clonage AGAP	Don d'INRA	YPD/Dropout media from Sunrise
<i>E. coli</i> TOP10	Souche de clonage	Invitrogen	LB <sub>10</sub>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Souche d'expression hétérologue classique	Invitrogen	LB <sub>10</sub>
<i>E. coli</i> DH10b	Souches de clonages	Invitrogen	LB <sub>10</sub>
<i>P.extremaustralis</i> 14-3b DSM 25547	Dérivé de la souche 14-3 (DSM 17835) qui a été isolée en antarctique	DSMZ	LB <sub>10</sub>

## V.2 Méthodes de biologie moléculaire

### V.2.1 Généralités sur les réactions en chaîne par polymérase

Pour les PCR « standards », une réaction sur 25  $\mu$ L a été préparée avec 0,5  $\mu$ L de *Taq* DNA polymérase (VWR) à 5 U/  $\mu$ L, 10 à 100 ng de matrice d'ADN, 0,5  $\mu$ L de dNTPs à 10 mM, 1,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM, 2,5  $\mu$ L de Key Buffer (10X) et 0,5  $\mu$ M de chaque amorce. Les conditions PCR classiques étaient le programme suivant : dénaturation de la matrice d'ADN pendant 2 minutes à 97°C suivie par les 30 cycles de PCR. Chaque cycle consistait en une étape de dénaturation à 97°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation entre 50 et 64°C pendant 30 sec et puis une étape d'élongation à 72 °C dépendant de la taille du fragment (1 min/kb). Une étape d'extension finale à 72 °C pendant 10 minutes a été ajoutée à la fin de l'ensemble des cycles.

Pour faire des clonages, l'enzyme *Phusion* High Fidelity ADN polymérase a été utilisée. Le programme PCR a été modifié sur le temps d'élongation à 72 °C (15-30 secondes/kb).

Pour faire le PCR sur des colonies, une colonie d'*E. coli* a été prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile pour être écrasé contre la paroi du tube de PCR contenant 10  $\mu$ L de l'eau stérile. Les cellules ont été PCR lysées à 95°C pendant 10 minutes dans un thermocycleur. Ensuite le mix de PCR classique a été ajouté et la PCR a été réalisée en suivant les instructions décrites ci-dessus.

### V.2.2 Procédure de clonage classique

Les fragments d'ADN à insérer ont été amplifiés par PCR et purifiés sur colonne utilisant le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-nagel). Les doubles digestions par les enzymes de restriction ont été effectuées à 37°C pendant la nuit (ou bien pendant 2 heures pour les enzymes Fast

Digest) dans un volume de 40  $\mu$ L. Les vecteurs et les inserts digérés ont été purifiés sur gel d'agarose à l'aide du même kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-nagel) et élués avec 15  $\mu$ L de tampon d'éluion. La ligation a été effectuée avec le T4 ADN polymérase à 15 °C pendant une nuit. *E. coli* DH10b a été transformée par le mix de ligation et les clones ont été sélectionnés sur milieu LB gélosé supplémenté avec l'antibiotique approprié.

### **V.2.3 Préparation des fragments d'ADN pour le clonage AGAP**

Les plasmides pACYCDuet-1 et pCOLADuet-1 ont été extraits à partir de 10 et 4 mL de culture, respectivement, à l'aide du kit GeneJET plasmid miniprep. Les plasmides pACYCDuet-1 et pCOLADuet-1 ont été digérés par *NcoI/XbaI* et *NotI/XbaI*, respectivement, pendant la nuit à 37 °C. Les enzymes ont été inactivées par la chaleur. Les inserts ont été amplifiés par PCR en utilisant la Taq ADN polymérase et ont été purifiés à partir d'un gel à 1% d'agarose à l'aide du kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up » (Macherey-nagel). L'éluion a été faite avec 30  $\mu$ L de tampon d'éluion dilué au dixième. Après évaporation, les produits PCR ont été repris dans 10  $\mu$ L d'eau milliQ. Les concentrations de l'ADN ont été mesurées par Nanovue.

### **V.2.4 Transformation de la levure pour le clonage AGAP**

La transformation dans *S. cerevisiae* BY4742 a été faite en suivant le protocole de Joska et al (2014) sans modifications<sup>150</sup>. Les levures transformants ont été sélectionnées sur le milieu Dropout His-Leu-Lys-Ura- gélosé (Sunrise Science) supplémenté avec de l'histidine (76 mg/L), de la leucine (380 mg/L) et de la lysine (50 mg/L) pendant 3 jours à 30 °C. `

## V.2.5 II.2.5 Vérification des plasmides recombinants chez la levure

Les transformants de la levure ont été d'abord vérifiés par PCR sur colonies. Pour cela, une colonie de la levure a été resuspendue dans 10 µL d'une solution de NaOH à 0,02 M et ce mélange a été incubé pendant 5 minutes à 98°C. Deux µL de cette suspension ont été utilisés ensuite comme matrice pour la PCR. Pour les clones qui semblaient corrects, l'extraction des plasmides à partir de 20 mL de culture de levure sur un milieu sélectif (SD-URA) s'est faite à l'aide d'une modification du protocole du kit GeneJET plasmid miniprep. Après avoir ajouté la solution de resuspension, les cellules de la levure ont été lysées à l'aide de l'appareil FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals). Le plasmide a été ensuite purifié sur colonne selon le protocole standard. Les transformations de l'*E. coli* rendue chimio-compétente par le méthode TSS ont été effectuées par le choc thermique en utilisant 1 à 3 µL du plasmide provenant de la levure. Les bactéries ont été sélectionnées sur milieu solide supplémenté de l'antibiotique approprié. Les plasmides ont ensuite été purifiés de l'*E. coli* et vérifiés par PCR, digestion et séquençage.

## V.2.6 Extraction d'ADN génomique de *P. extremaustralis*

L'ADN génomique a été préparé à partir de 40 mL de culture de *P. extremaustralis* en LB en phase stationnaire. Après centrifugation, les cellules ont été reprises dans 10 mL de tampon SET (NaCl à 75 mM, EDTA à 25 mM (pH 8), Tris-HCl à 20 mM (pH 7.5)) auquel 300 µL d'EDTA à 0.5 M ainsi que 500 µL de lysozyme à 50 mg/mL ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 30 minutes suivi par l'ajout de 500 µL de protéinase K à 20 mg/mL et 5 mL de SDS à 10%. L'incubation de ce mélange a été ensuite faite à 55°C pendant au moins 1 h. Cinq mL de NaCl à 5 M ont été ajoutés et l'ensemble a été mélangé par retournement. Le mélange a été laissé à température ambiante pendant 15 minutes. Enfin, 30 mL de chloroforme ont été ajoutés puis les deux phases ont été séparées par centrifugation à 4000 g pendant 5 minutes à 4 °C. La phase supérieure (phase aqueuse) a été prélevée et subit une nouvelle centrifugation à 13000 rpm. Un volume équivalent d'isopropanol a été ajouté dans le surnageant pour précipiter l'ADN génomique (l'ADNg). L'ADNg a été prélevé délicatement pour être lavé rapidement dans 1 mL d'EtOH à 70% par trempage puis dans 1 mL de l'eau milliQ. L'ADNg a été repris dans 1 mL de l'eau milliQ pendant la nuit à 4°C. La concentration de l'ADNg de cette préparation était 10 µg/µL.

## V.2.7 Capture directe par TAR cloning (Transformation-associated recombination)

Les plasmides de capture sont ceux qui ont été préparés par la méthode AGAP. Ils ont été linéarisés par digestion avec l'enzyme *SpeI* à 37°C pendant la nuit. Ils ont ensuite été purifiés sur gel à 1% d'agarose et purifiés par le kit miniprep kit GeneJET Plasmid. L'ADN génomique a été digéré soit par *NdeI* soit doublement digéré par *NdeI* et *ClaI* à 37°C pendant la nuit. Les sphéroblastes ont été préparés à partir de 100 mL de culture avec une DO de 0,7-1 de *S. cerevisiae* VL6-48 (ATCC-MYA-3666). Le protocole est une modification du protocole de Yamanaka et al (2014). La Zymolase 20T à 10mg/mL est utilisée à la concentration de 0,08 U/mL pour 40 mL solution SPE dans laquelle on a ajouté au préalable (5 minutes avant) 40 µL de 2-β-mercaptoethanol à 14 mM. Les levures ont été reprises dans du 40 mL de solution SPE (Sorbitol à 1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 0.01 M, Na<sub>2</sub>EDTA à 0.01 M, pH 7.5) après avoir été lavé deux fois avec 50 mL de sorbitol à 1M. Lorsque qu'un rapport DO<sub>600(Sorb)</sub>/DO<sub>600(SDS)</sub> de l'ordre de 10 (la DO est mesurée après avoir dilué les sphéroblastes au demi dans du sorbitol ou dans une solution d'H<sub>2</sub>O contenant 2% de SDS et après avoir fait le blanc pour chacune des dilutions) est obtenu les sphéroblastes sont mis à 4°C pendant la nuit avec 100 mL de sorbitol 1M pour faire une stabilisation osmotique. Après avoir été lavés deux fois avec 100 mL de Sorbitol 1M à 4°C et centrifugés à une vitesse ne dépassant pas les 600g, les sphéroblastes ont été repris dans 4 mL de solution STC.( Sorbitol à 1 M, HCl-Tris- à 0,01 M ; CaCl<sub>2</sub> 0.01 M ; ph 7,5). Les transforation ont été faite avec entre 400 ng et 1000 ng de plasmides et en utilisant entre 1200 ng et 2500 d'ADN génomique simplement ou doublement digérés. Les témoins positifs ont été fait avec du plasmide circulaire. Des ont été mis sphéroblastes sur des milieux non sélectifs pour évaluer la régénération. La sélection a été fait sur le milieu Dropout His-Leu-Lys-Ura- gélosé 2,5% (pour le fond de la boîte) et 3% (pour la partie TOP) à additionné de sorbitol 1M pendant 7 jours à 30 °C. L'agar utilisé doit impérativement être de la marque Bacto®Agar. Le sorbitol est un « agarolytique ». Les colonies ont été repiquées repiquées sur un milieu sélectif sans sorbitol et après deux jours d'incubation, des PCR colonies ainsi que des mises en culture liquide ont été effectuées.

## VI Résultats

### VI.1 Construction d'un système d'expression par capture directe

#### VI.1.1 Construction du vecteur d'expression pACYC AGAPv1\_Mbt

##### VI.1.1.1 Design du vecteur pACYC AGAPV1\_Mbt

Le vecteur navette de capture pACYCAGAPv1 a été conçu comme illustré sur la Figure 15. Il est dérivé du vecteur pACYCduet-1 qui s'exprime dans *E. coli* et qui possède une origine de réplication p15A occasionnant un faible taux de copies. Ceci devrait permettre une meilleure stabilité des plasmides de grande taille. Pour que le vecteur navette puisse se répliquer chez la levure nous y avons ajouté la cassette YCC (yeast cloning cassette) provenant du plasmide pRS426. Cette cassette comporte une origine de réplication de la levure  $2\mu ori$  ainsi que le gène *ura3* permettant la sélection des levures transformées sur un milieu déficient en uracile. Nous avons choisi d'ajouter deux séquences d'environ 1 kb en amont (UP) et en aval (DN) du cluster Mbn\_Pex comme bras homologues pour la recombinaison homologue. Un site de restriction *SpeI* a été ajouté entre le fragment UP et DN afin de pouvoir linéariser le vecteur (voir figure 23).

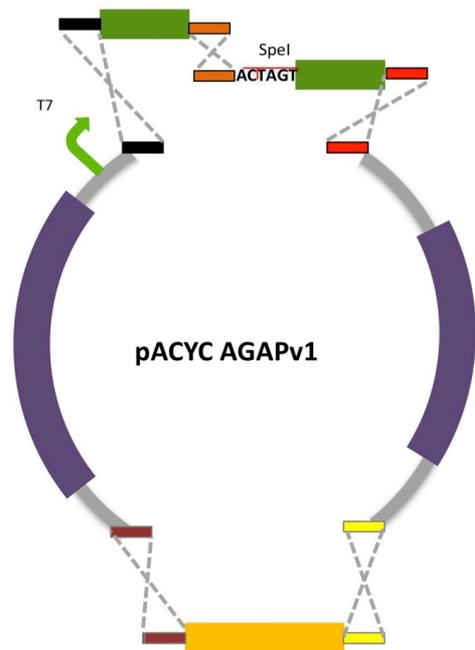
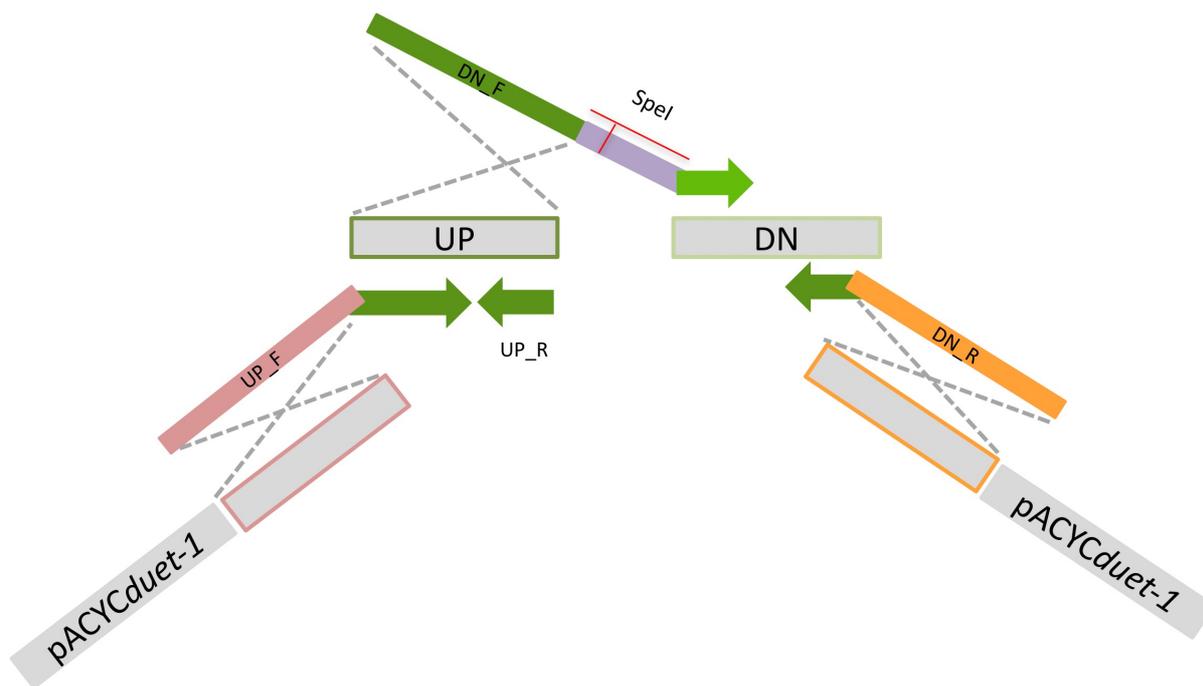


Figure 23 : Design de pACYC AGAPv1. En jaune la cassette YCC, en violet les éléments du plasmide pACYCduet-1, en vert les bras de capture UP et DN.



**Figure 24 : Principe de design des amorces utilisé pour la recombinaison homologue AGAP. Exemple avec pACYC AGAPv1**

#### VI.1.1.2 Résultats

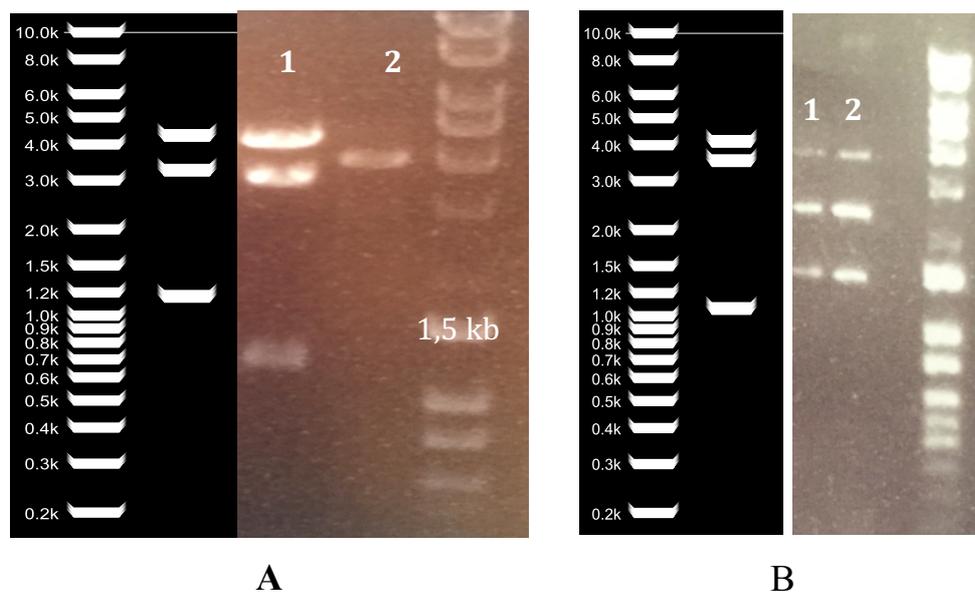
Les fragments UP et DN ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique de *P. extremaustralis*. La cassette YCC a été générée par PCR en utilisant pRS426 comme matrice. Tous les produits PCR ont été purifiés à partir du gel d'agarose. Le vecteur pACYCduet-1 a été linéarisé par digestion avec *NdeI* et *XbaI*. Après inactivation des enzymes de restriction, le vecteur digéré a été utilisé directement pour la transformation. L'assemblage des quatre fragments d'ADN (le vecteur linéaire, YCC, UP, DN) a été effectué chez la levure *S. cerevisiae* BY4742 selon le protocole AGAP de Joska et al <sup>151</sup>.

Nous avons utilisé 800 ng de chaque produit PCR ainsi que 400 ng de pACYCduet-1 linéaire pour la transformation dans la souche de *S. cerevisiae* BY4742 rendue compétente avec l'acétate de lithium (LiOAC). Les transformants de la levure ont été sélectionnés sur un milieu sans uracile. 20 clones ont été obtenus après incubation à 30°C pendant 3 jours. Cinq plasmides aléatoires ont été purifiés à partir de la levure pour être transformés dans *E. coli* DH10b.

#### VI.1.1.3 Vérifications

La vérification s'est faite par digestion avec l'enzyme *PstI*. Trois fragments étaient attendus : 4300 pb, 1995 pb et 2372 pb. Les 5 clones sont corrects comme le montre la Figure 26. Cette technique a

une très grande efficacité. L'insertion des fragments UP et DN a été confirmée par le séquençage en utilisant les amorces universelles T7term (voir annexe n°1).



**Figure 25 :** A/ Migration sur gel d'agarose à 1% de pACYC AGAPv1 digéré pendant 2h avec l'enzyme *PstI* FD. Le puits n°1 est pACYC AGAPv1 digéré. Le puits n°2 le même vecteur non digéré. Les fragments obtenus (à droite) correspondent aux profils de digestion attendus (à gauche). Le témoin correspond au même plasmide non digéré sous sa forme super-enroulé. B/ Digestion d'un plasmide d'une colonie positive de *E. coli* TOP10. Le puits n°1 contient le plasmide purifié, le n°2 pACYCduet-1. Le profil de digestion est identique à celui de pACYCduet-1 qui est le témoin (plasmide vide).

#### VI.1.1.4 Comparaison de la recombinaison homologue avec *E. coli*

Il a été démontré que *E. coli* peut faire de la recombinaison homologue<sup>152</sup>. Nous avons voulu savoir si *E. coli* était capable d'assembler nos fragments d'ADN. Pour cela nous avons réalisé les mêmes étapes que précédemment dans *E. coli* TOP10.

La souche a été transformée avec 250 ng de chaque produit PCR (UP, DN, YCC) et 130 ng de vecteur linéarisé (pACYCduet1). Un total de 30 transformants a été obtenu. Les PCR sur les colonies avec les amorces T7 et T7term ont montré que toutes les colonies étaient des pACYCduet1 sans insert. Cela pourrait être due à la linéarisation incomplète du plasmide. Nous avons essayé différentes stratégies pour contourner ce problème : 1/ purification du plasmide linéarisé par *SpeI* sur gel ; 2/ génération des fragments de pACYCduet1 par PCR ; 3/ digestion de ces derniers fragments par l'enzyme *DpnI* pour détruire l'ADN méthylé. Aucune de ces stratégies ne donnent de clones corrects (Figure 26B).

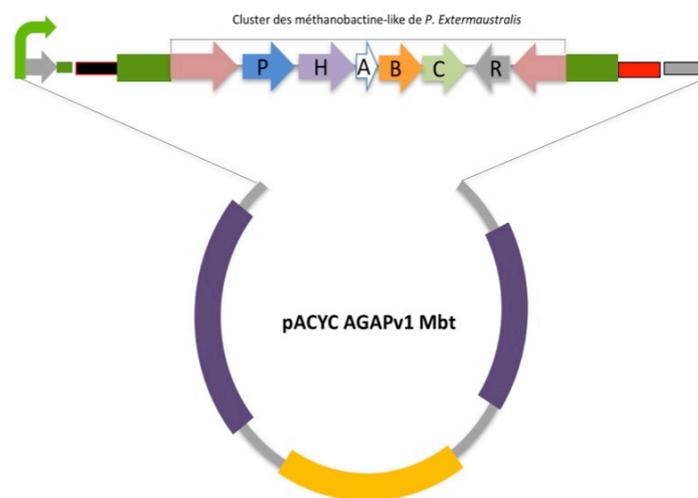
### VI.1.1.5 La capture directe du cluster mbt\_Pex

#### i. Préparation du vecteur et de l'ADNg

Le plasmide pACYC AGAPv1 a été linéarisé par *SpeI* puis purifié sur gel. L'ADN génomique de *P. extremaustralis* a été digéré avec *NdeI* ou avec *NdeI* et *ClaI*.

#### ii. Préparation des sphéroblastes

Pour préparer les sphéroblastes nous avons tout d'abord utilisé le protocole de Yamanaka et al<sup>148</sup> qui est une version légèrement modifiée du protocole de Kouprina et al<sup>146</sup>. Les levures en phase stationnaire (50 mL de culture avec une DO entre 5 et 8 repris dans 20 mL de milieu d'incubation) sont incubées entre 20 et 40 minutes avec 0,02 U lyticase/mL (Zymolase 20T). Une étape de stabilisation osmotique a été ajoutée avant l'incubation avec l'enzyme. Pour cela, les levures sont mises en suspension dans du sorbitol 1M durant une nuit à 4°C. Aucun sphéroblaste n'a été obtenu.



**Figure 26 : Structure du vecteur pACYC AGAPv1\_mbt (après capture directe)**

D'autres tentatives ont été faites en augmentant progressivement la concentration de Zymolase 20T jusqu'à 2U/mL, soit 100 fois la concentration décrite dans le protocole. A cette concentration, un faible nombre de sphéroblastes a été obtenu. Les sphéroblastes sont quantifiés en mesurant la différence de densité optique entre des sphéroblastes dans du sorbitol ( $DO_{600(Sorb)}$ ) et des sphéroblastes dans du SDS à 2% ( $DO_{600(SDS)}$ ). Les sphéroblastes n'ayant plus de paroi se lysent à cause du choc osmotique. Dans cette condition nous avons obtenu un ratio proche de 3. Ce résultat n'est pas suffisant

pour la capture, d'autant que la  $DO_{600(Sorb)}$  a chuté d'un facteur 4 ( $DO$  à 0,9 à T0 et  $DO$  à 0,15 à T40). Pour un ratio de 5 on considère qu'il y a 80% de sphéroblastes. Il y a donc moins de 80 % de sphéroblastes dans le milieu et ils sont en très faible nombre. Un essai de régénération sur un milieu non sélectif n'a pas été concluant.

Après une recherche approfondie dans la littérature, nous avons utilisé un autre protocole pour faire des sphéroblastes ([https://www.addgene.org/static/data/plasmids/59/59981/59981-attachment\\_7dNMMrPvnaVF.pdf](https://www.addgene.org/static/data/plasmids/59/59981/59981-attachment_7dNMMrPvnaVF.pdf)). Les levures ont été utilisées dans la phase logarithmique ( $DO_{600}$  : 0,7-1). La Zymolase 20T est utilisée avec une concentration de 0,08 U/mL (4 fois plus élevée que le protocole précédent). Le 2- $\beta$  mercaptoéthanol (14 mM) est ajouté avant et non plus au même moment que l'enzyme. Un ratio  $DO_{600(Sorb)}/DO_{600(SDS)}$  proche de 10 a été obtenu après 48 minutes de traitement avec la Zymolase 20T à 30°C. Ceci correspond à plus de 90% de sphéroblastes (Figure 25).

### iii. Transformation des sphéroblastes

Les sphéroblastes de *S. cerevisiae* VL6-48 ont été transformés selon le protocole de Yamanaka et al<sup>148</sup> avec 400 ng pACYC AGAPv1 linéarisé et 1,2  $\mu$ g d'ADN génomique digéré par *NdeI* ou doublement digéré par *NdeI* et *ClaI* pour chaque transformation. Pour les deux conditions (simplement digéré ou doublement) 3 transformants ont été obtenus.

#### iv. Vérification des transformants

La PCR sur colonie utilisant les amorces pour amplifier le gène *mbn-P* a montré que 3 clones sur les 6 semblent correct : 1 pour l'ADNg simplement digéré et 2 pour l'ADNg doublement digéré (Figure 27).



**xFigure 27 : Colonie PCR du gène *mbnP* des levures après capture directe du cluster *mbn\_Pex*. L'ADNg des puits de 1 à 3 est digéré par *NdeI*, et par *NdeI/ClaI* pour les puits de 4 à 6 sont les colonies. Les deux B sont des blancs sans matrice. Seulement 50% des clones sont corrects.**

Les transformants repiqués en milieu liquide sélectif (SD-URA) ne poussent pas. Pourtant les souches poussent après deux repiquages successifs sur milieu sélectif solide. Nous ne sommes donc pas en mesure de faire les vérifications par digestion et séquençage pour le moment.

## VI.1.2 Construction du vecteur d'expression pACYC AGAPs3\_Mbt

### VI.1.2.1 Design du vecteur pACYC AGAPV1\_Mbt

Ce vecteur de capture possède les mêmes éléments que le précédent mais une organisation différente. Le gène *ura3* a été déplacé entre les deux fragments UP and DN (Figure 28). De cette façon une première sélection pour la construction du vecteur de capture est possible sur un milieu déficient en uracile. Lors de la capture directe le gène *ura3* n'est plus présent. Le gène *ura3* code l'enzyme

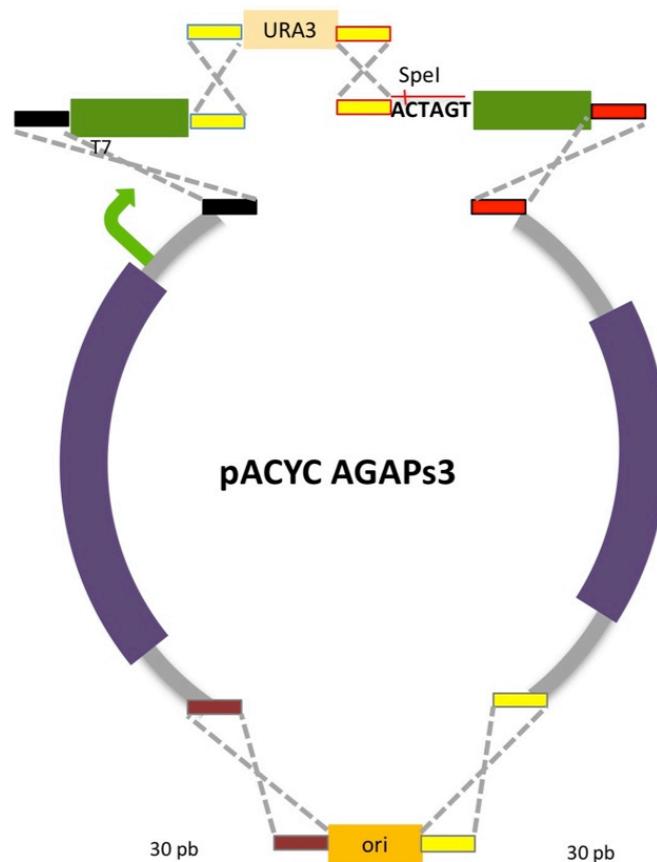
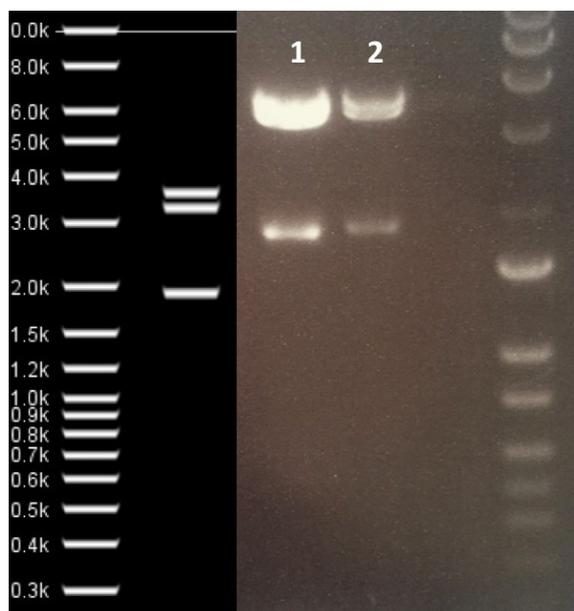


Figure 28 : Design de pACYC AGAPs3. En jaune la cassette YCC, en violet les éléments du plasmide pACYCduet-1, en vert les bras de capture UP et DN.

orotidine 5'-phosphate décarboxylase (ODCase) qui catalyse une réaction de synthèse de ribonucléotides pyrimidiques qui composent l'ARN. En l'absence de ce gène la levure n'est plus capable de synthétiser de l'uracile. Cela a pour conséquence d'empêcher son développement sans uracile ou uridine dans le milieu <sup>153</sup>. Au contraire si du 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) est ajouté au milieu, l'ODCase active va convertir le 5-FOA en 5-fluorouracil qui est un composant toxique causant la mort cellulaire. Les plasmides recombinants ont éjecté *ura3*. En présence de 5-FOA ils ne seront pas toxiques pour les levures. On sélectionne contre le gène *ura3* pour la capture directe.

### VI.1.2.2 Résultats

Selon le même protocole de Joska et al nous avons utilisé 800 ng de chaque insert (UP, DN, URA3, 2 $\mu$ ORI) et 400 ng de vecteur linéarisé (à l'aide de *Nde* I et *Xba*I). Les clones recombinants ont été sélectionnés sur un milieu sans uracile. Nous avons obtenu 3 colonies dont les plasmides ont été transformés dans *E.coli* DH10b.



**Figure 29 : Profil de digestion de pACYC AGAPs3 par l'enzyme *Mun*I. 1 et 2 sont deux plasmides venant de deux colonies. A gauche le profil attendu, à droite le profil obtenu.**

### VI.1.2.3 Vérification

Pour la digestion avec l'enzyme *Mun*I, nous attendions deux fragments à 3300 pb et 3700 pb ainsi qu'un fragment à 2100 pb. Comme le montre la Figure 21, 2 clones sur 3 obtenus sont corrects. Le séquençage avec les amorces AGAPCheck\_R et T7term viennent confirmer ces résultats (voir annexe n°2).

## VI.1.3 Construction du vecteur d'expression pCOLA AGAPv1\_Mbt

### VI.1.3.1 Construction du vecteur navette

#### i. Design de pCOLA AGAPv1 Mbn

La stratégie utilisée est la même que pour le plasmide pACYC AGAPv1 sauf pour le plasmide de

départ qui est le plasmide pCOLAduet1 dont l'origine ColA ori maintient un nombre élevé de plasmides dans la bactérie. Le plasmide est doublement digéré par les enzymes *NotI* et *XbaI*. Les inserts UP et DN sont amplifiés par Taq PCR de la même façon que précédemment permettant la recombinaison avec le « backbone » du plasmide. L'insert YCC est strictement identique car les séquences autour du site *XbaI* sont les mêmes chez pCOLAduet-1 que chez pACYCduet-1.

## ii. Résultats

Nous avons utilisé 800 ng de chaque insert amplifié par PCR, purifié sur gel d'agarose (UP, DN, YCC) secondairement. 400 ng de vecteur linéarisé non purifié (à l'aide de *Not I* et *XbaI*) ont été transformés dans la souche de *S. cerevisiae* BY4742 rendue compétente avec du LiOAC 0,1 M et du PEG 3500. Les clones recombinants ont été sélectionnés sur un milieu sans uracile.

Ce plasmide pose problème : 1/ la première transformation n'a donné aucun clone ; 2/ un deuxième essai a donné trois clones. Sur ces trois clones les transformations dans *E.coli* n'ont donné que 5 clones, dont les fragments de digestion ne correspondent pas à ceux que l'on devait obtenir. Faute de temps ces observations n'ont pu être approfondies.

## **VI.2 Construction par recombinaison homologue chez la levure du cluster natif**

Les amorces ont été commandées la première semaine de juin. Cette construction ne sera pas réalisée avant le rendu de ce rapport. Les gènes seront amplifiés par PCR à l'aide d'une polymérase *Phusion* qui est une enzyme haute-fidélité. Les premiers essais avec une telle enzyme n'ont pas permis d'amplification. Il y a donc un travail important d'optimisation. Le cluster est divisé en 3 parties R1, R2, R3.

## **VI.3 Construction d'un système d'expression par clonage à l'aide d'enzymes de restriction**

Cette stratégie consiste à cloner séquentiellement les cinq gènes impliqués dans la biosynthèse de Mbt\_Pex (*mbnA*, *mbnB*, *mbnC*, *mbnP*, *mbnH*), chacun sous contrôle de leur propre promoteur T7 dans un vecteur d'expression pour *E. coli*. Pour cela les gènes seront clonés au préalable sous les promoteurs T7 dans pACYC (pour *mbnA*) ou pET 28b(+) (pour *mbnB*, *mbnC*, *mbnP* et *mbnH*). Les gènes avec leur promoteur T7 seront ensuite amplifiés par PCR et insérés en séquence dans

pCOLAduet-1 avec l'aide d'une série d'enzymes de restriction (Figure 30).

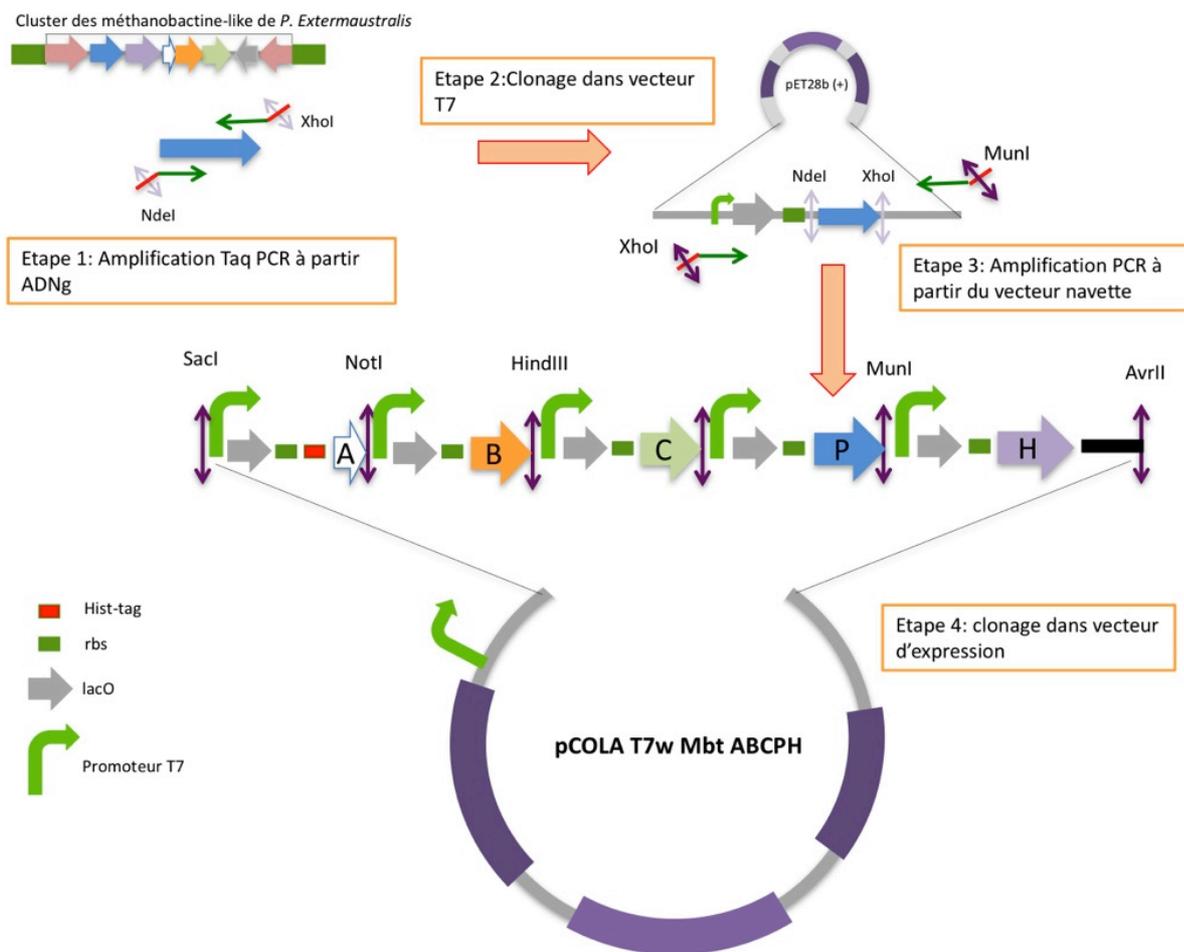


Figure 30 : Stratégie de construction du système d'expression hétérologue à l'aide d'enzymes de restriction

### VI.3.1 Préparation des inserts par PCR

Nous disposons déjà au laboratoire pACYC\_mbnA, pET28\_mbnB et pET28\_mbnC construit. Ces gènes avec le promoteur T7 ont été obtenus par PCR avec l'ADN Polymerase *Phusion* (Figure 31).

Ces fragments ont été purifiés à partir du gel d'agarose et stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour les étapes suivantes.

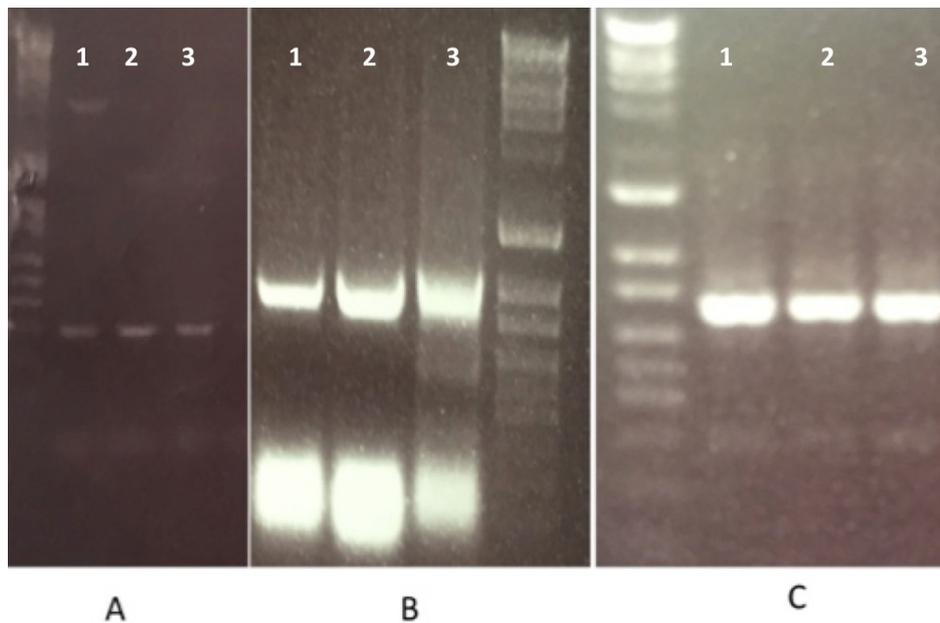


Figure 31 : A/ PCR colonies de pACYC\_*mbnA* avec les amorces spécifique de *mbnA* (100pb) 1,2 et 3 sont des colonies différentes B/PCR préparative de *mbnB* (980pb) à partir de pET28\_*mbnB* avec les primers MbnB\_F et MbnB-R, 1,2et3 sont identiques ; C/PCR préparative de *mbnC* avec les primers MbnC\_Fet MbnC\_R à partir de pet28\_C (700pb), 1,2et3 sont identiques.

### VI.3.2 Construction de pCOLA\_*mbnA*

Le produit PCR T7-*mbnA* a été inséré entre le site *SacI* et *NotI* dans pCOLA<sub>duet1</sub>. Le plasmide généré a été confirmé par PCR (Figure 24), et le séquençage (voir annexe °4).

### VI.3.3 Construction de pCOLA\_*mbnA\_mbnB*

L'insert T7-*mbnB* a été amplifié par PCR et digéré par *NotI* et *HindIII*. Le vecteur pCOLA\_*mbnA* a été linéarisé avec les mêmes enzymes de restriction et purifié. Après ligation avec un ratio insert/vecteur 3 :1, seul des faux positifs ont été obtenus. Nous avons fait varier les ratios insert/vecteur pour la ligation (2, 4 ou 5) tous sans succès. Il est probable que la digestion avec les enzymes *NotI* et *HindIII* ne soit pas correcte.

### VI.3.4 Construction du vecteur pET28-*mbnP*

Nous avons amplifié ce gène à partir de l'ADN génomique de *P. extremaustralis*. Pour cela nous avons utilisé la *Taq* ADN polymérase pour le PCR. Le gène a été inséré entre le site *NdeI* et *XhoI* dans pET28b (+). L'insertion de *mbnP* a été confirmée par PCR (Figure 32). Cependant le séquençage

a mis en évidence deux mutations sur la séquence de *mbnP* : à la position c345 T>C soit le changement d'une Glutamine par une Tyrosine et c484A>G soit la substitution d'une Leucine par une Argine (voir annexe n°4).

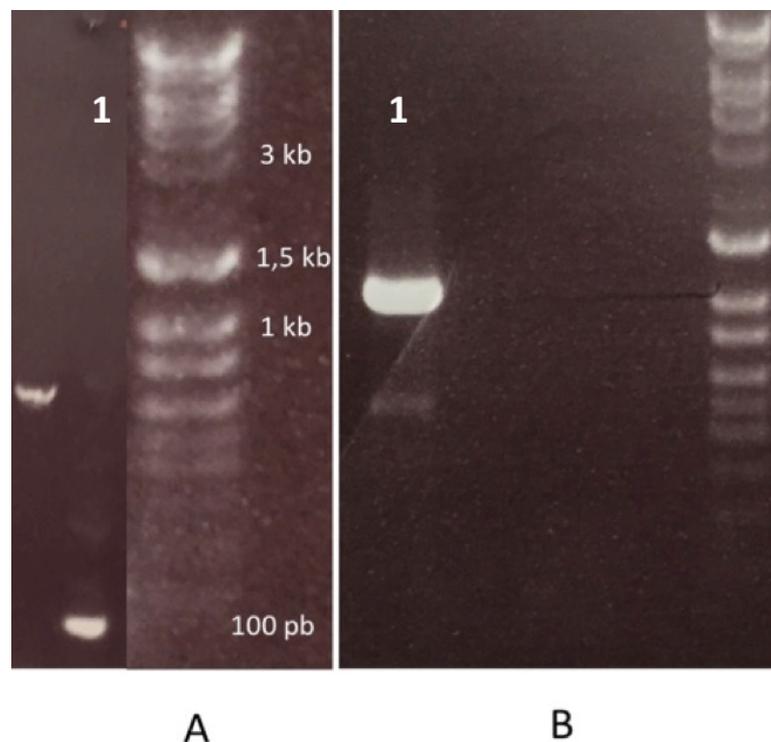


Figure 32 : A/ Puit 1, PCR du gène *mbnA* avec ses amorces spécifiques à partir du plasmide pCOLA\_ *mbnA* B/ Puit 1 PCR du gène *mbnP* de pET28\_ *mbnP* avec les amorces MbtP\_F2 et MbtP\_R

## VII Discussions

### VII.1 La recombinaison homologe pour construire un vecteur et capturer un cluster

#### VII.1.1 La construction des plasmides avec AGAP

Le protocole AGAP (Any-gene-any-plasmid) porte bien son nom. C'est une méthode simple apportant beaucoup de flexibilité. Cette méthode permet en une seule étape d'obtenir un vecteur navette qui est à la fois un vecteur de clonage, un vecteur de capture et un vecteur d'expression.

La reproductibilité du protocole de Joska et al<sup>46</sup> permet une optimisation aisée. Il faut faire attention à utiliser des levures fraîchement étalées sur une boîte de pétri. En effet après deux semaines, les

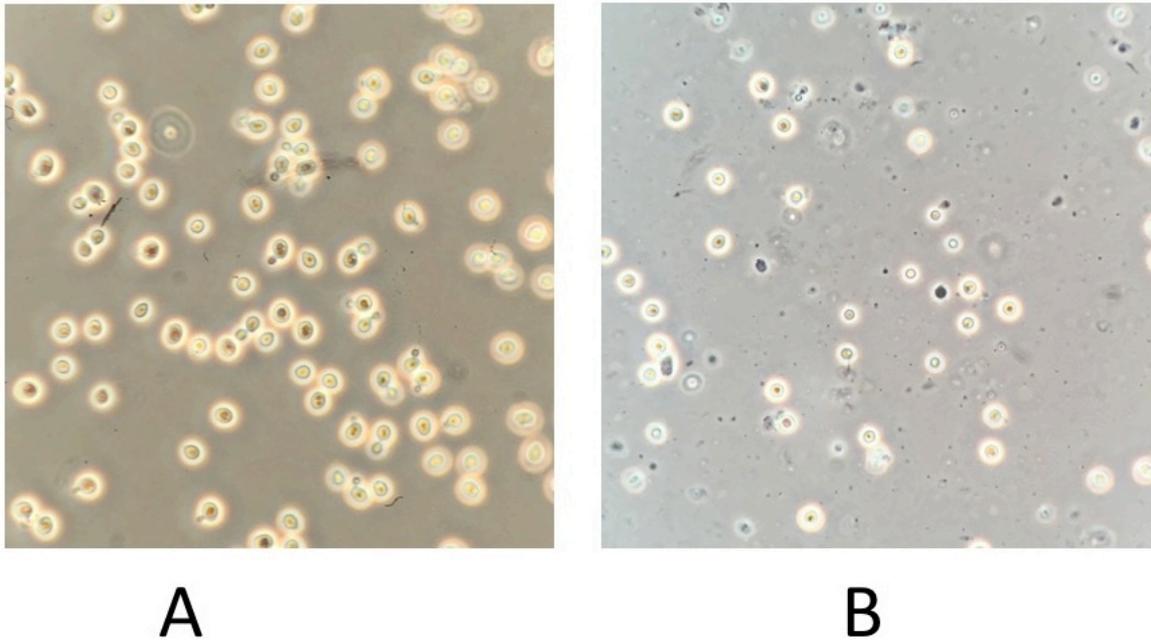
levures perdent beaucoup en efficacité même après une préculture. Des souches dérivées de *S. cerevisiae* S288 (MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0) doivent être utilisées comme *S. cerevisiae* BY4742. Leur génotype contient des marqueurs de sélection délétés ainsi que d'autres délétions sur des éléments que l'on retrouve classiquement dans les plasmides<sup>154</sup>. Le principal inconvénient est la quantité importante d'ADN nécessaire (entre 0,5-1  $\mu$ g) comparé aux clonages classiques qui nécessitent entre 3 et 5 fois moins d'ADN.

Il est également important de prendre en compte le temps relativement long de doublement des levures (1h30) par rapport à *E.coli* (20 minutes). Huit heures sont nécessaires pour préparer des levures compétentes, deux à trois jours pour que des colonies isolées apparaissent sur une boîte, puis à nouveau 15 heures pour mettre en culture les levures afin de purifier le plasmide. Le plasmide doit être ensuite transformé dans une souche de clonage (24 h). Au total, pour obtenir une quantité importante de plasmides recombinants, 5 jours de travail sont nécessaires auxquels on rajoute trois jours en amont pour amplifier les fragments PCR et préparer le vecteur de départ. En 8 jours il est donc possible d'obtenir un plasmide contenant n'importe quelle cassette de sélection avec n'importe quel gène (voir annexe n°5).

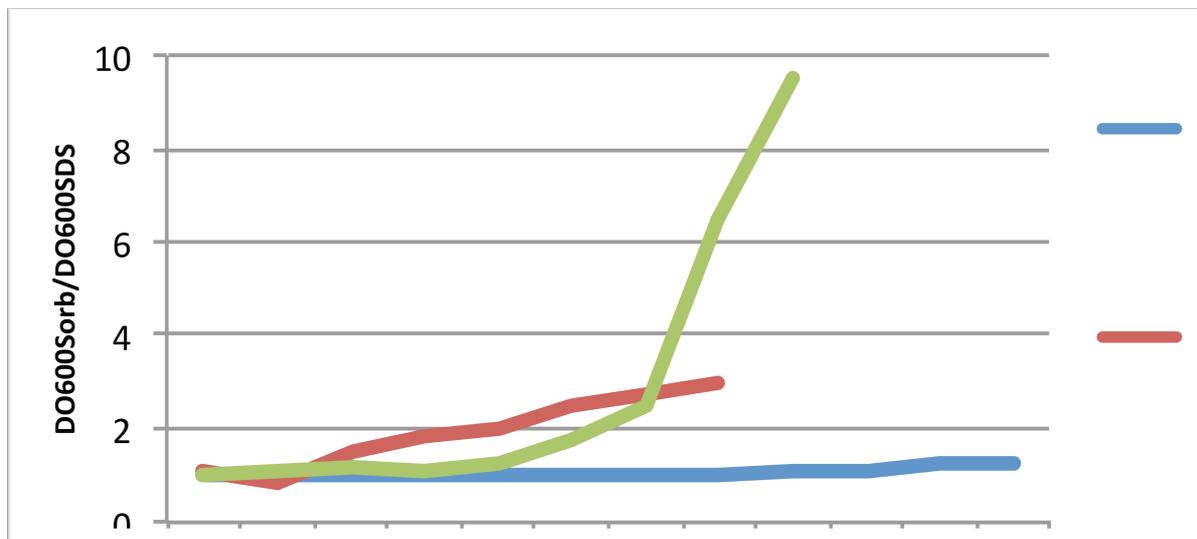
Les transformations sont très efficaces (proche de 100%) jusqu'à des recombinaisons avec 6 fragments. De cette façon nous avons obtenu deux vecteurs : l'un avec les éléments de la levure regroupés dans une seule cassette (pACYC AGAPv1), l'autre avec le gène *ura3* entre les deux bras de capture UP et DN (pACYC AGAPs3). Pour l'instant l'assemblage du vecteur pCOLA AGAPv1 ne fonctionne pas.

## VII.1.2 Le clonage TAR

La principale difficulté consiste en l'obtention de sphéroblastes. Pour notre premier essai nous avons utilisé le protocole décrit par Yamanaka et al, sans succès. L'utilisation des levures dans leur phase stationnaire (DO 5-8) n'est pas efficace. En microscopie optique (grossissement x1000) il n'est pas évident de distinguer les sphéroblastes des levures (Figure 33). De même, la mesure de la densité optique à 600 nm dans du SDS 2% ne montre pas de lyse. Pour obtenir quelques sphéroblastes, la quantité de Zymolase 20T a été multipliée par 100 (Figure 34).



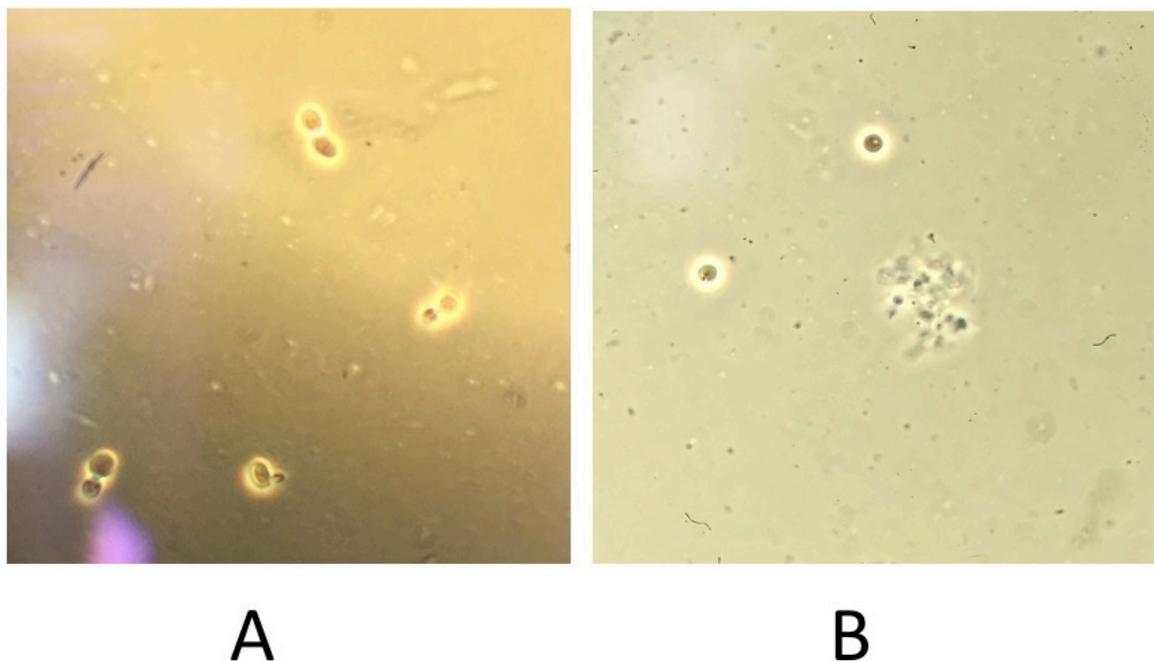
**Figure 33 : Observation par microscopie optique de *S.cerevisiae* avec un grossissement x1000 pendant l'incubation à 30°C avec 0,02 U/mL de Zymolase 20T. A/Levures à T0 en phase stationnaire. Le corps cellulaire est rond et entouré d'un halo lumineux large. B/ Levures à T40 minutes.**



**Figure 34 : Ratio  $DO_{600(Sorb)}/DO_{600(SDS)}$  en fonction du temps. L'incubation se fait à 30°C avec une agitation lente (150 rpm). Plus la valeur est grande plus il y a de sphéroblastes.**

Il est possible que la paroi cellulaire de la levure soit moins accessible à la Zymolase 20T lorsque la levure ne se divise plus. La quantité d'enzyme utilisée pour obtenir quelques sphéroblastes est très importante (100 fois la concentration de départ). Les sphéroblastes ainsi obtenus sont très instables. Nous n'avons pu obtenir de régénération sur un milieu non sélectif. Il est possible que les sphéroblastes n'aient pas survécu aux étapes de centrifugation même à 600g.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé avec succès des levures en phase logarithmique pour faire des sphéroblastes. La Zymolase 20T a été utilisée avec une concentration de 0,08 U/mL pendant 48 minutes. Morphologiquement, il est facile de distinguer les sphéroblastes. Les levures « jeunes » sont allongées (Figure 35).



**Figure 35 : Observation par microscopie optique de *S. cerevisiae* avec un grossissement x1000 pendant l'incubation à 30°C avec 0,08 U/mL de Zymolase. A/Levures à T0 en phase logarithmique. Le corps cellulaire est ovale. B/ Levures à T40 minute. Le corps cellulaire est rond.**

Le ratio  $DO_{600(Sorb)}/DO_{600(SDS)}$  est proche de 10 (Figure 34), la régénération donne un tapis de cellules. Nous avons utilisé ces sphéroblastes pour faire les transformations.

Avec 400 ng pACYC AGAPv1 linéarisé et 1.2  $\mu$ g d'ADN génomique digéré pour une transformation, nous avons obtenu 3 clones corrects sur 6. La souche *S. cerevisiae* VL6-48 (MAT alpha, his3-D200, trp1-D1, ura3-52, lys2, ade2-101, met14, psi+cir0) possède le gène *ura3* inactivé mais pas délété. Il est possible et fort probable que des événements de recombinaison entre le plasmide et l'ADN génomique surviennent. Même après purification sur gel, il est possible que du vecteur circulaire soit toujours présent. Ces deux explications à l'efficacité modérée (50%) pour un cluster de petite taille (10 kb) peuvent être contournées en employant le plasmide pACYC AGAPs3 avec ajout de 5-FOA dans le milieu de sélection. Les essais sont en cours.

Notre protocole doit être amélioré car nous n'avons obtenu que 6 clones dont 3 corrects avec le plasmide pACYC AGAPv1. Yamanaka et al obtiennent plusieurs dizaines de clones pour des clusters de 60 kb.

Nous avons obtenu un plasmide avec le cluster de la méthanobactine-like (Mbn-Pex) : pACYC AGAP\_v1\_Mbn. Le clone de levure recombinant ne pousse pas en milieu sélectif liquide. Pourtant, ce clone a été repiqué deux fois sur un milieu solide sans uracile, ce qui exclu un faux positif dû à la présence d'uracile dans la levure (Figure 36). Nous ne pouvons pas pour l'instant transformer le plasmide dans une souche de *E.coli*, ni confirmer l'exactitude de la construction par digestion et séquençage.



**Figure 36 : Repiquage sur milieu sélectif des colonies de levure après capture direct dont le gène *mbnP* à été amplifié par PCR**

## **VII.2 La construction du plasmide par clonage classique**

Le séquençage a confirmé l'insertion du gène *mbnA* dans pCOLAduet-1. Nous n'arrivons pas à insérer le gène *mbnB*. Plusieurs explications existent mais ne sont que des suppositions : 1/ l'insert *mbnB* ou le vecteur n'est pas correctement digéré par les enzymes *NotI* et *HindIII* (suite à des mutations sur les sites de restrictions ?) ; 2/ la ligation est difficile et possède un mauvais rendement ; 3/ le vecteur pCOLA\_*mbnA\_mbnB* n'est pas stable car il est maintenu en grande quantité dans la levure.

Le séquençage du plasmide pET28b (+)-*mbnP* montre deux mutations (voir annexe n°4 ) L'utilisation d'une enzyme TAQ pour faire la PCR à partir de l'ADNg est une explication.

Deux mutations sur un gène si court (moins de 1kb) est statistiquement improbable : une Taq polymérase a une fidélité de  $10^{-5}$  mutation par pb. Il peut s'agir d'une erreur de séquençage du génome de *P. extremaustralis*. Néanmoins ce type de construction est susceptible d'engendrer des mutations car chaque gène sera amplifié deux fois.

Ce clonage reste intéressant car cela permet de supprimer toute régulation native et d'obtenir une forte production de chaque enzyme ou peptide cloné sous le promoteur T7.

### VII.3 La biologie de synthèse à l'aide de la levure

Les travaux effectués à ce stade montrent l'intérêt de la recombinaison homologe chez la levure pour la construction de système d'expression hétérologue. En quatre semaines, il est possible de capturer n'importe quel cluster (jusqu'à 250 kb) pour l'assembler dans un vecteur d'expression pour un coût réduit (voir annexe n°6) <sup>146</sup>

On peut imaginer transformer le plasmide contenant le cluster d'intérêt directement dans une souche d'expression sans passer par une souche de clonage comme *E.coli* DH10b ou TOP10. Pour cela il faut optimiser l'extraction plasmidique de la levure qui n'a pas un bon rendement.

Pour conclure, cette méthode est un outil formidable pour exprimer de façon hétérologue un cluster silencieux, surtout si l'expression hétérologue se fait dans une souche proche de la souche de départ : il n'y a pas de plasmide contenant les marqueurs et les origines de répllication pour des souches bactériennes peu étudiées. Cette méthode permet de contourner ce problème. Les seules limitations sont : 1/ travailler sur un hôte procaryote ; 2/ le génome de la souche contenant le cluster doit être séquencé pour pouvoir choisir les bras de capture.

Par comparaison le clonage classique présente plusieurs inconvénients. Chaque gène sera amplifié deux fois par PCR multipliant ainsi les risques de mutation. Le nombre de clonages, de PCR, de digestion, de ligation est important. Chaque étape peut être limitante, comme c'est le cas actuellement avec le clonage de *mbnB* dans pCOLA T7w *mbnA*. Cette méthode a tout de même l'avantage de placer sous un promoteur fort inductible et indépendant chaque gène d'intérêt. Il faut faire tout de même attention lors de l'induction car la traduction de toutes ces protéines en si grand nombre risque

d'être délicate et d'entraîner des précipitations ou des inclusions. D'autre part cette méthode ne peut pas s'appliquer à de grands clusters contenant plusieurs dizaines de gènes.

## VIII Conclusion et perspectives

Ce stage a permis : 1) la mise en place d'un protocole de recombinaison homologe chez la levure pour assembler les multiples fragments d'ADN ; 2) la mise en place d'un protocole de la capture directe des clusters des gènes à partir de l'ADN génomique chez la levure ; 3) la conception et la construction d'un vecteur pour l'expression du cluster Mbt\_Pex chez *E. coli* ; enfin 4) l'initiation d'autres stratégies de clonage pour construire un tel système. La perspective immédiate de ce travail sera de tester l'expression du cluster chez *E. coli* BL21(DE3) utilisant le vecteur pACYC\_AGPAv3\_mbt construit. Il faudra optimiser les conditions d'expression en variant la température de culture et le milieu (milieu riche ou milieu pauvre). Le peptide présent dans les extraits sera analysé par chromatographie liquide couplée au spectrométrie de masse. De plus, il sera envisageable d'effectuer les manipulations génétiques sur le cluster, e. g. l'addition d'un promoteur inductible qui faciliterait la production du peptide. L'analyse se fera par guidage LC-MS en comparant l'extrait d'un milieu avec induction et l'extrait d'un milieu sans induction. Une fois les conditions de production identifiées, le peptide Mbn\_Pex sera purifié en quantité suffisante pour le caractériser par RMN et cristallographie.

En parallèle de ces étapes, la construction d'un système d'expression hétérologue représente le point de départ pour étudier la biosynthèse des méthanobactines. Le cluster est sur un plasmide, ce qui facilite la modification génétique dans *E. coli*. Cela permet de supprimer des gènes ou d'en générer des variants facilement à l'aide des nombreux outils génétiques disponible comme PCR targeting<sup>155</sup>.

# REFERENCES

1. Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D. & Robinson, N. J. Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**, 823–830 (2009).
2. Hood, M. I. & Skaar, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 525–537 (2012).
3. Ma, Z., Jacobsen, F. E. & Giedroc, D. P. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* **109**, 4644–4681 (2009).
4. Bobrov, A. G. *et al.* The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice. *Mol. Microbiol.* **93**, 759–775 (2014).
5. Schalk, I. J., Hannauer, M. & Braud, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**, 2844–2854 (2011).
6. Kraepiel, A. M. L., Bellenger, J. P., Wichard, T. & Morel, F. M. M. Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **22**, 573–581 (2009).
7. Bundy, J. G., Kille, P., Liebeke, M. & Spurgeon, D. J. Metallothioneins May Not Be Enough—The Role of Phytochelatins in Invertebrate Metal Detoxification. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 885–886 (2014).
8. Kim, H. J. Methanobactin, a Copper-Acquisition Compound from Methane-Oxidizing Bacteria. *Science* **305**, 1612–1615 (2004).
9. Duckworth, O. W., Bargar, J. R. & Sposito, G. Coupled biogeochemical cycling of iron and manganese as mediated by microbial siderophores. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **22**, 605–613 (2009).
10. Hernlem, B. J., Vane, L. M. & Sayles, G. D. The application of siderophores for metal recovery and waste remediation: examination of correlations for prediction of metal affinities. *Water Res.* **33**, 951–960 (1999).
11. Boukhalfa, H., Reilly, S. D. & Neu, M. P. Complexation of Pu(IV) with the natural siderophore desferrioxamine B and the redox properties of Pu(IV)(siderophore) complexes. *Inorg. Chem.* **46**, 1018–1026 (2007).
12. Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T. & Schalk, I. J. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.* **11**, 1079–1091 (2009).
13. Schenkeveld, W. D. C., Reichwein, A. M., Temminghoff, E. J. M. & van Riemsdijk, W. H. Effect of Soil Parameters on the Kinetics of the Displacement of Fe from FeEDDHA Chelates by Cu. *J. Phys. Chem. A* **116**, 6582–6589 (2012).
14. Harrington, J. M. *et al.* Trace metal complexation by the triscatecholate siderophore protochelin: structure and stability. *BioMetals* **25**, 393–412 (2012).
15. Whisenhunt, D. W. *et al.* Specific Sequestering Agents for the Actinides. 29. Stability of the Thorium(IV) Complexes of Desferrioxamine B (DFO) and Three Octadentate Catecholate or Hydroxypyridinonate DFO Derivatives: DFOMTA, DFOCAMC, and DFO-1,2-HOPO. Comparative Stability of the Plutonium(IV) DFOMTA Complex(1). *Inorg. Chem.* **35**, 4128–4136 (1996).
16. Cukrowski, I., Cukrowska, E., Hancock, R. D. & Anderegg, G. The effect of chelate ring size on metal ion size-based selectivity in polyamine ligands containing pyridyl and saturated nitrogen donor groups. *Anal. Chim. Acta* **312**, 307–321 (1995).
17. Ambundo, E. A. *et al.* Influence of Coordination Geometry upon Copper(II/I) Redox Potentials. Physical Parameters for Twelve Copper Tripodal Ligand Complexes. *Inorg. Chem.* **38**, 4233–4242 (1999).
18. Farkas, E., Buglyó, P., Enyedy, É. A., Gerlei, V. A. & Santos, A. M. Factors affecting the metal ion–hydroxamate interactions: effect of the position of the peptide function in the connecting chain on the Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids. *Inorganica Chim. Acta* **339**, 215–223 (2002).
19. Farkas, E., Buglyó, P., Enyedy, É. A. & Amelia Santos, M. Factors affecting the metal ion–hydroxamate interactions II: effect of the length of the connecting chain on the Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids. *Inorganica Chim. Acta* **357**, 2451–2461 (2004).
20. Vorobev, A. *et al.* Detoxification of Mercury by Methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5918–5926 (2013).
21. Schenkeveld, W. D. C. *et al.* Metal mobilization from soils by phytosiderophores – experiment and equilibrium modeling. *Plant Soil* **383**, 59–71 (2014).
22. Vonwiren, N., Romheld, V., Morel, J., Guckert, A. & Marschner, H. Influence of microorganisms on iron acquisition in maize. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 371–376 (1993).
23. Black, A. *et al.* Metal bioavailability dynamics during a two-year trial using ryegrass (*Lolium perenne* L.) grown in soils treated with biosolids and metal salts. *Soil Res.* **50**, 304 (2012).
24. Peijnenburg, W. J. G. M., Zablotskaja, M. & Vijver, M. G. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **67**, 163–179 (2007).
25. Santner, J., Smolders, E., Wenzel, W. W. & Degryse, F. First observation of diffusion-limited plant root phosphorus uptake from nutrient

- solution: First observation of diffusion-limited P uptake. *Plant Cell Environ.* **35**, 1558–1566 (2012).
26. van Leeuwen, H. P. *et al.* Dynamic Speciation Analysis and Bioavailability of Metals in Aquatic Systems. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8545–8556 (2005).
  27. Adriano, D. C. *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals.* (Springer Science & Business Media, 2001).
  28. Weng, L., Temminghoff, E. J. M. & Van Riemsdijk, W. H. Contribution of Individual Sorbents to the Control of Heavy Metal Activity in Sandy Soil. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 4436–4443 (2001).
  29. Stumm, W. Reactivity at the mineral-water interface: dissolution and inhibition. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **120**, 143–166 (1997).
  30. Cheah, S.-F., Kraemer, S. M., Cervini-Silva, J. & Sposito, G. Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron. *Chem. Geol.* **198**, 63–75 (2003).
  31. Duckworth, O. W., Akafia, M. M., Andrews, M. Y. & Bargar, J. R. Siderophore-promoted dissolution of chromium from hydroxide minerals. *Env. Sci Process. Impacts* **16**, 1348–1359 (2014).
  32. Borer, P. M., Sulzberger, B., Reichard, P. & Kraemer, S. M. Effect of siderophores on the light-induced dissolution of colloidal iron(III) (hydr)oxides. *Mar. Chem.* **93**, 179–193 (2005).
  33. Duckworth, O. W., Bargar, J. R. & Sposito, G. Sorption of ferric iron from ferrioxamine B to synthetic and biogenic layer type manganese oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72**, 3371–3380 (2008).
  34. Kraemer, S. M., Crowley, D. E. & Kretzschmar, R. in *Advances in Agronomy* **91**, 1–46 (Elsevier, 2006).
  35. Pierwola, A., Krupinski, T., Zalupski, P., Chiarelli, M. & Castignetti, D. Degradation Pathway and Generation of Monohydroxamic Acids from the Trihydroxamate Siderophore Deferrioxamine B. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 831–836 (2004).
  36. Villanueva Bermejo, D. *et al.* Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents: Extraction of thymol from thyme using green solvents. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 2901–2907 (2015).
  37. Parker, D. L., Sposito, G. & Tebo, B. M. Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 4809–4820 (2004).
  38. Takagi, S., Kamei, S. & Yu, M. Efficiency of iron extraction from soil by mugineic acid family phytosiderophores. *J. Plant Nutr.* **11**, 643–651 (1988).
  39. Kraemer, S. M. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat. Sci. - Res. Boundaries* **66**, 3–18 (2004).
  40. Inoue, H. *et al.* Rice OsYSL15 Is an Iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. *J. Biol. Chem.* **284**, 3470–3479 (2009).
  41. Fukushima, T. *et al.* Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 13821–13826 (2013).
  42. Yehuda, Z., Shenker, M., Hadar, Y. & Chen, Y. Remedy of chlorosis induced by iron deficiency in plants with the fungal siderophore rhizoferrin. *J. Plant Nutr.* **23**, 1991–2006 (2000).
  43. Nevitt, T. War-Fe-re: iron at the core of fungal virulence and host immunity. *BioMetals* **24**, 547–558 (2011).
  44. Winkelmann, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **20**, 379–392 (2007).
  45. Traxler, M. F., Seyedsayamdost, M. R., Clardy, J. & Kolter, R. Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy: Xenosiderophores alter development in actinomycetes. *Mol. Microbiol.* **86**, 628–644 (2012).
  46. Kenney, G. E. & Rosenzweig, A. C. Genome mining for methanobactins. *BMC Biol.* **11**, 17 (2013).
  47. Schalk, I. J. & Guillon, L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environ. Microbiol.* **15**, 1661–1673 (2013).
  48. Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J. & Buchanan, S. K. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 43–60 (2010).
  49. Cascales, E. *et al.* Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **71**, 158–229 (2007).
  50. Brickman, T. J., Cummings, C. A., Liew, S.-Y., Relman, D. A. & Armstrong, S. K. Transcriptional Profiling of the Iron Starvation Response in *Bordetella pertussis* Provides New Insights into Siderophore Utilization and Virulence Gene Expression. *J. Bacteriol.* **193**, 4798–4812 (2011).
  51. Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E. & Henderson, J. P. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 731–736 (2012).
  52. Gi, M. *et al.* A novel siderophore system is essential for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in airway mucus. *Sci. Rep.* **5**, 14644 (2015).
  53. Patel, U., Baxi, M. D. & Modi, V. V. Evidence for the involvement of iron siderophore in the transport of molybdenum in cowpea *Rhizobium*. *Curr. Microbiol.* **17**, 179–182 (1988).
  54. Saxena, B., Vithlani, L. & Modi, V. V. Siderophore-mediated transport of molybdenum in *Azospirillum lipoferum* strain D-2. *Curr. Microbiol.* **19**, 291–295 (1989).
  55. Bellenger, J. P., Wichard, T. & Kraepiel, A. M. L. Vanadium Requirements and Uptake Kinetics in the Dinitrogen-Fixing Bacterium

- Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1478–1484 (2008).
56. Howard, J. B. & Rees, D. C. How many metals does it take to fix N<sub>2</sub>? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17088–17093 (2006).
  57. Duhme, A.-K., Hider, R. C., Naldrett, M. J. & Pau, R. N. The stability of the molybdenum-azotochelin complex and its effect on siderophore production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **3**, 520–526 (1998).
  58. Bellenger, J.-P. *et al.* Complexation of oxoanions and cationic metals by the biscatecholate siderophore azotochelin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 367–376 (2007).
  59. Bellenger, J. P., Wichard, T., Kustka, A. B. & Kraepiel, A. M. L. Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. *Nat. Geosci.* **1**, 243–246 (2008).
  60. Arai, Y. X-ray Absorption Spectroscopic Investigation of Molybdenum Multinuclear Sorption Mechanism at the Goethite–Water Interface. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 8491–8496 (2010).
  61. Boer, J. L., Mulrooney, S. B. & Hausinger, R. P. Nickel-dependent metalloenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **544**, 142–152 (2014).
  62. Bellion, E. The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life (da Silva, J. J. R. Frausto; Williams, R. J. P.). *J. Chem. Educ.* **69**, A326 (1992).
  63. Dupont, C. L., Barbeau, K. & Palenik, B. Ni Uptake and Limitation in Marine Synechococcus Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 23–31 (2008).
  64. Li, Y. & Zamble, D. B. Nickel Homeostasis and Nickel Regulation: An Overview. *Chem. Rev.* **109**, 4617–4643 (2009).
  65. Dosanjh, N. S. & Michel, S. L. Microbial nickel metalloregulation: NikRs for nickel ions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 123–130 (2006).
  66. Heddle, J., Scott, D. J., Unzai, S., Park, S.-Y. & Tame, J. R. H. Crystal Structures of the Liganded and Unliganded Nickel-binding Protein NikA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 50322–50329 (2003).
  67. Cherrier, M. V. *et al.* Crystallographic and Spectroscopic Evidence for High Affinity Binding of FeEDTA(H<sub>2</sub>O)<sup>-</sup> to the Periplasmic Nickel Transporter NikA. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10075–10082 (2005).
  68. Cherrier, M. V., Cavazza, C., Bochot, C., Lemaire, D. & Fontecilla-Camps, J. C. Structural Characterization of a Putative Endogenous Metal Chelator in the Periplasmic Nickel Transporter NikA<sup>†‡</sup>. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 9937–9943 (2008).
  69. Morel, F. M. M. The co-evolution of phytoplankton and trace element cycles in the oceans. *Geobiology* **6**, 318–324 (2008).
  70. Saito, M. A. & Moffett, J. W. Complexation of cobalt by natural organic ligands in the Sargasso Sea as determined by a new high-sensitivity electrochemical cobalt speciation method suitable for open ocean work. *Mar. Chem.* **75**, 49–68 (2001).
  71. Vraspir, J. M. & Butler, A. Chemistry of Marine Ligands and Siderophores. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **1**, 43–63 (2009).
  72. Wiley: Advanced Inorganic Chemistry, 6th Edition - F. Albert Cotton, Geoffrey Wilkinson, Carlos A. Murillo, *et al.* Available at: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471199575.html>. (Accessed: 21st November 2016)
  73. Akafia, M. M., Harrington, J. M., Bargar, J. R. & Duckworth, O. W. Metal oxyhydroxide dissolution as promoted by structurally diverse siderophores and oxalate. *Geochim. Cosmochim. Acta* **141**, 258–269 (2014).
  74. Arguello, J. M., Raimunda, D. & Padilla-Benavides, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, (2013).
  75. Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. & Rosen, B. P. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 652–656 (2000).
  76. Seeger, M. A. *et al.* Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**, 1295–1298 (2006).
  77. Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C. & Montfort, W. R. Cuprous Oxidase Activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 7815–7817 (2004).
  78. Dupont, C. L., Grass, G. & Rensing, C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. *Metallomics* **3**, 1109–1118 (2011).
  79. Chillappagari, S. *et al.* Copper Stress Affects Iron Homeostasis by Destabilizing Iron-Sulfur Cluster Formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **192**, 2512–2524 (2010).
  80. Changela, A. Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR. *Science* **301**, 1383–1387 (2003).
  81. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. in *Methods in Enzymology* **186**, 1–85 (Elsevier, 1990).
  82. Anderegg, G., L'Eplattenier, F. & Schwarzenbach, G. Hydroxamatkomplexe II. Die Anwendung der pH-Methode. *Helv. Chim. Acta* **46**, 1400–1408 (1963).
  83. Christenson, E. A. & Schijf, J. Stability of YREE complexes with the trihydroxamate siderophore desferrioxamine B at seawater ionic strength. *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 7047–7062 (2011).
  84. Dahlheimer, S. R., Neal, C. R. & Fein, J. B. Potential Mobilization of Platinum-Group Elements by Siderophores in Surface Environments. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 870–875 (2007).
  85. Farkas, E., Bátka, D., Kremper, G. & Pócsi, I. Structure-based differences between the metal ion selectivity of two siderophores desferrioxamine B (DFB) and desferricoprogen (DFC): Why DFC is much better Pb(II) sequestering agent than DFB? *J. Inorg. Biochem.* **102**, 1654–

1659 (2008).

86. Mishra, B., Haack, E. A., Maurice, P. A. & Bunker, B. A. Effects of the Microbial Siderophore DFO-B on Pb and Cd Speciation in Aqueous Solution. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 94–100 (2009).
87. Frazier, S. W., Kretschmar, R. & Kraemer, S. M. Bacterial Siderophores Promote Dissolution of UO<sub>2</sub> under Reducing Conditions. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 5709–5715 (2005).
88. Moll, H. *et al.* Curium(III) complexation with pyoverdins secreted by a groundwater strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BioMetals* **21**, 219–228 (2008).
89. Ahmed, E. & Holmström, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications: Siderophores in environmental research. *Microb. Biotechnol.* **7**, 196–208 (2014).
90. Abergel, R. J. *et al.* BIOMIMETIC ACTINIDE CHELATORS: AN UPDATE ON THE PRECLINICAL DEVELOPMENT OF THE ORALLY ACTIVE HYDROXYPYRIDONATE DECORPORATION AGENTS 3,4,3-LI(1,2-HOPO) AND 5-LIO(ME-3,2-HOPO). *Health Phys.* **99**, 401–407 (2010).
91. Kraemer, S. M., Xu, J., Raymond, K. N. & Sposito, G. Adsorption of Pb(II) and Eu(III) by Oxide Minerals in the Presence of Natural and Synthetic Hydroxamate Siderophores. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1287–1291 (2002).
92. Wolff-Boenisch, D. & Traina, S. J. The effect of desferrioxamine B on the desorption of U(VI) from Georgia kaolinite KGa-1b and its ligand-promoted dissolution at pH 6 and 25 °C. *Chem. Geol.* **242**, 278–287 (2007).
93. Foley, T. L. & Simeonov, A. Targeting iron assimilation to develop new antibacterials. *Expert Opin. Drug Discov.* **7**, 831–847 (2012).
94. Walshe, J. M. Cause of death in Wilson disease. *Mov. Disord.* **22**, 2216–2220 (2007).
95. Gitlin, J. D. Wilson disease. *Gastroenterology* **125**, 1868–1877 (2003).
96. Weiss, K. H. & Stremmel, W. Evolving Perspectives in Wilson Disease: Diagnosis, Treatment and Monitoring. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **14**, 1–7 (2012).
97. Roberts, E. A. & Schilsky, M. L. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology* **47**, 2089–2111 (2008).
98. Roy-Chowdhury, J. & Schilsky, M. L. Gene therapy of Wilson disease: A ‘golden’ opportunity using rAAV on the 50th anniversary of the discovery of the virus. *J. Hepatol.* **64**, 265–267 (2016).
99. Spincemaille, P. *et al.* The plant decapeptide OSIP108 prevents copper-induced apoptosis in yeast and human cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**, 1207–1215 (2014).
100. Pujol, A. M. *et al.* Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 286–296 (2011).
101. Walshe, J. M. & Yealland, M. Chelation treatment of neurological Wilson’s disease. *Q. J. Med.* **86**, 197–204 (1993).
102. Cappellini, M. D., Musallam, K. M. & Taher, A. T. Overview of Iron Chelation Therapy with Desferrioxamine and Deferiprone. *Hemoglobin* **33**, S58–S69 (2009).
103. Xin, J. *et al.* Methanobactin-Mediated One-Step Synthesis of Gold Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21676–21688 (2013).
104. Garber, K. Cancer’s copper connections. *Science* **349**, 129–129 (2015).
105. Garber, K. Targeting copper to treat breast cancer. *Science* **349**, 128–129 (2015).
106. Semrau, J. D., DiSpirito, A. A. & Yoon, S. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 496–531 (2010).
107. Jiang, H. *et al.* Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochem. Eng. J.* **49**, 277–288 (2010).
108. Haynes, C. A. & Gonzalez, R. Rethinking biological activation of methane and conversion to liquid fuels. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 331–339 (2014).
109. Balasubramanian, R. *et al.* Oxidation of methane by a biological dicopper centre. *Nature* **465**, 115–119 (2010).
110. Culpepper, M. A. & Rosenzweig, A. C. Architecture and active site of particulate methane monooxygenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 483–492 (2012).
111. Martinho, M. *et al.* Mössbauer studies of the membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* bath: evidence for a Diron center. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15783–15785 (2007).
112. Kim, H. J. *et al.* Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science* **305**, 1612–1615 (2004).
113. Téllez, C. M., Gaus, K. P., Graham, D. W., Arnold, R. G. & Guzman, R. Z. Isolation of copper biochelates from *Methylosinus trichosporium* OB3b and soluble methane monooxygenase mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1115–1122 (1998).
114. Kim, H. J. *et al.* Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science* **305**, 1612–1615 (2004).
115. Behling, L. A. *et al.* NMR, mass spectrometry and chemical evidence reveal a different chemical structure for methanobactin that contains oxazolone rings. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12604–12605 (2008).
116. Krentz, B. D. *et al.* A comparison of methanobactins from *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis* strain Sb2 predicts methanobactins are synthesized from diverse peptide precursors modified to create a common core for binding and reducing copper ions. *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 10117–10130 (2010).

117. El Ghazouani, A. *et al.* Variations in methanobactin structure influences copper utilization by methane-oxidizing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8400–8404 (2012).
118. Bandow, N. *et al.* Spectral and copper binding properties of methanobactin from the facultative methanotroph *Methylocystis* strain SB2. *J. Inorg. Biochem.* **110**, 72–82 (2012).
119. Kim, H. J., Galeva, N., Larive, C. K., Alterman, M. & Graham, D. W. Purification and physical-chemical properties of methanobactin: a chalkophore from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 5140–5148 (2005).
120. Crosa, J. H. & Walsh, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **66**, 223–249 (2002).
121. Stein, L. Y. *et al.* Genome sequence of the obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* strain OB3b. *J. Bacteriol.* **192**, 6497–6498 (2010).
122. Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M. & Moriyama, Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 587–593 (2006).
123. Kuroda, T. & Tsuchiya, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 763–768 (2009).
124. He, X. *et al.* Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* **467**, 991–994 (2010).
125. Gu, W. *et al.* A TonB-dependent Transporter is Responsible for Methanobactin Uptake by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.03884–15 (2016). doi:10.1128/AEM.03884-15
126. Kenney, G. E. & Rosenzweig, A. C. Chemistry and biology of the copper chelator methanobactin. *ACS Chem. Biol.* **7**, 260–268 (2012).
127. Balasubramanian, R., Kenney, G. E. & Rosenzweig, A. C. Dual pathways for copper uptake by methanotrophic bacteria. *J. Biol. Chem.* **286**, 37313–37319 (2011).
128. Schauer, K., Rodionov, D. A. & de Reuse, H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the ‘tip of the iceberg’? *Trends Biochem. Sci.* **33**, 330–338 (2008).
129. Koebnik, R. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol.* **13**, 343–347 (2005).
130. Ferguson, A. D. *et al.* Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 513–518 (2007).
131. Braun, V., Mahren, S. & Ogierman, M. Regulation of the Fecl-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 173–180 (2003).
132. Braun, V. & Endriss, F. Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **20**, 219–231 (2007).
133. Li, Y. M., Milne, J. C., Madison, L. L., Kolter, R. & Walsh, C. T. From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* **274**, 1188–1193 (1996).
134. Nolan, E. M. & Walsh, C. T. How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **10**, 34–53 (2009).
135. Arndt, H.-D., Schoof, S. & Lu, J.-Y. Thiopeptide antibiotic biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **48**, 6770–6773 (2009).
136. Li, Y. M., Milne, J. C., Madison, L. L., Kolter, R. & Walsh, C. T. From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* **274**, 1188–1193 (1996).
137. López, N. I. *et al.* *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment. *Curr. Microbiol.* **59**, 514–519 (2009).
138. Tribelli, P. M. *et al.* Novel Essential Role of Ethanol Oxidation Genes at Low Temperature Revealed by Transcriptome Analysis in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One* **10**, e0145353 (2015).
139. Rutledge, P. J. & Challis, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 509–523 (2015).
140. Chaudhary, A. K., Dhakal, D. & Sohng, J. K. An insight into the ‘-Omics’ based engineering of streptomycetes for secondary metabolite overproduction. *BioMed Res. Int.* **2013**, (2013).
141. Ongley, S. E., Bian, X., Neilan, B. A. & Müller, R. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 1121–1138 (2013).
142. Flinspach, K., Kapitzke, C., Tocchetti, A., Sosio, M. & Apel, A. K. Heterologous Expression of the Thiopeptide Antibiotic GE2270 from *Planobispora rosea* ATCC 53733 in *Streptomyces coelicolor* Requires Deletion of Ribosomal Genes from the Expression Construct. *PLOS ONE* **9**, e90499 (2014).
143. Fu, J. *et al.* Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res.* **36**, e113 (2008).
144. Perlova, O., Gerth, K., Kuhlmann, S., Zhang, Y. & Müller, R. Novel expression hosts for complex secondary metabolite megasynthetases: Production of myxochromide in the thermophilic isolate *Coralloccoccus macrosporus* GT-2. *Microb. Cell Factories* **8**, 1 (2009).
145. Ongley, S. E. *et al.* High Titer Heterologous Production of Lyngbyatoxin in *E. coli*, a Protein Kinase C Activator from an Uncultured Marine Cyanobacterium. *ACS Chem. Biol.* **8**, (2013).
146. Kouprina, N. & Larionov, V. Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning

in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Protoc.* **3**, 371–377 (2008).

147. Kim, J. H. *et al.* Cloning large natural product gene clusters from the environment: Piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR. *Biopolymers* **93**, 833–844 (2010).
148. Yamanaka, K. *et al.* Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1957–1962 (2014).
149. R, O. K., Vo, K. T., Michaelis, S. & Paddon, C. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* **25**, 451–452 (1997).
150. Joska, T. M., Mashruwala, A., Boyd, J. M. & Belden, W. J. A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *J. Microbiol. Methods* **100**, 46–51 (2014).
151. Joska, T. M., Mashruwala, A., Boyd, J. M. & Belden, W. J. A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *J. Microbiol. Methods* **100**, 46–51 (2014).
152. Quan, J. & Tian, J. Circular polymerase extension cloning. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1116**, 103–117 (2014).
153. Flynn, P. J. & Reece, R. J. Activation of Transcription by Metabolic Intermediates of the Pyrimidine Biosynthetic Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 882–888 (1999).
154. Mortimer, R. K. & Johnston, J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**, 35–43 (1986).
155. Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. & Chater, K. F. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1541–1546 (2003).

ANNEXE N°1 : pACYC AGAPv1

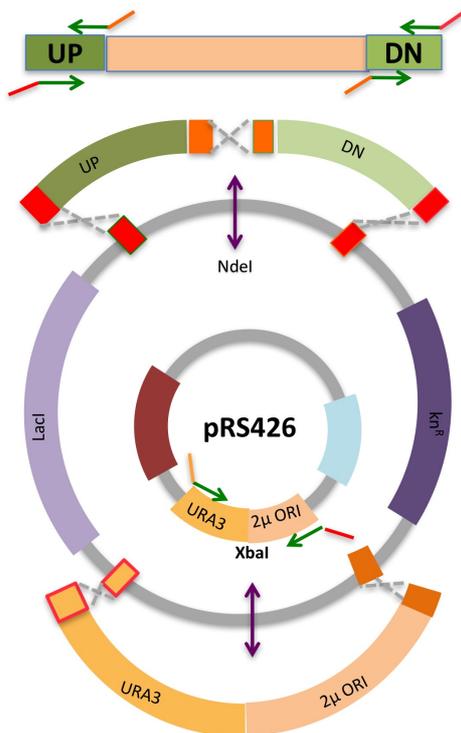
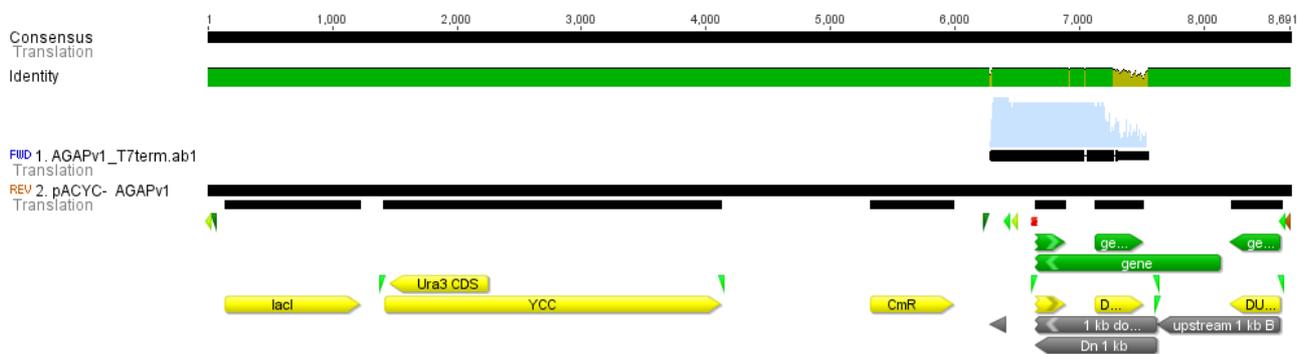


Figure 28 : Design de la construction de pACYC AGAPv1 avec la position des amorces

Nom de l'insert	Primer Forward	Primer Reverse	Template
YCC (ura3+ori)	YCC ACYC F XbaI	YCC ACYC R XbaI	pRS426
UP	Forward 1 kb upstream	Reverse 1 kb upstream	ADNg <i>P.extremaustralis</i>
DN	Forward 1 kb downstream	Reverse 1 kb downstream	ADNg <i>P.extremaustralis</i>

Figure 29 : Primers et template utilisés pour amplifier par PCR les fragments de pCOLA AGAPv1, voir MM pour séquence des primers



## ANNEXE N°2 : pACYC AGAPs3

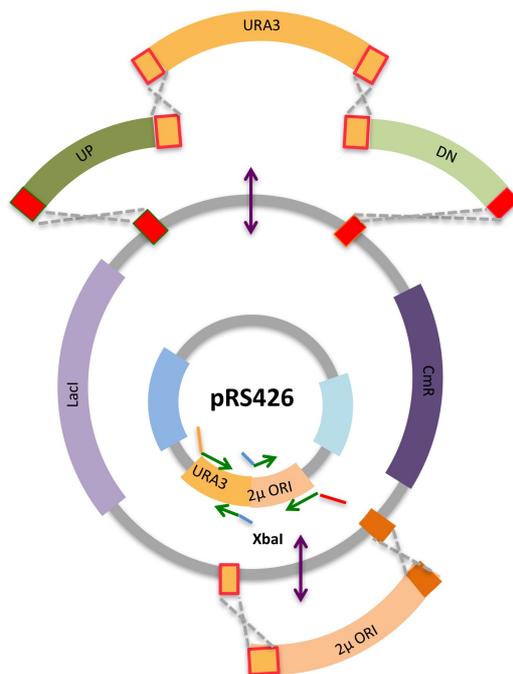


Figure 30 : Design de la construction de pACYC AGAPs3 avec la position des primers

Nom de l'insert	Primer Forward	Primer Reverse	Template
URA3	URA3 forward	URA3 reverse	pRS426
2uORI	YCC ACYC F XbaI	2microori reverse	pRS426
UP	Forward 1 kb upstream	Reverse 1 kb upstream	ADNg <i>P.extremaustralis</i>
DN	Forward 1 kb down stream	Reverse 1 kb downstream	ADNg <i>P.extremaustralis</i>

Figure 31 : Primers et template utilisés pour amplifier par PCR les fragments de pACYC AGAPs3, voir MM pour séquence des primers

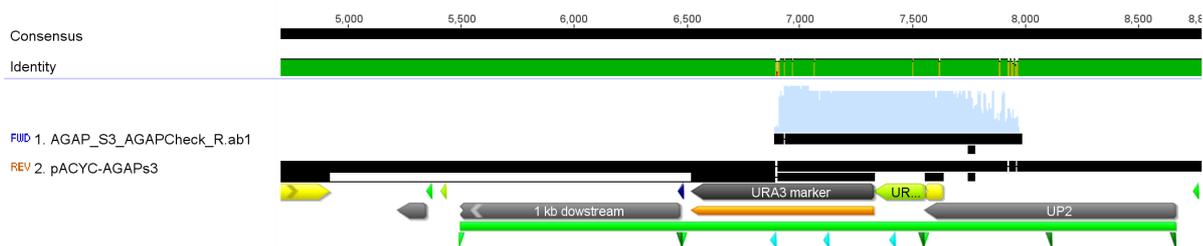


Figure 32 : Séquencage de pACYC AGAPs3 permettant d'observer la jonction entre UP et le gène ura3

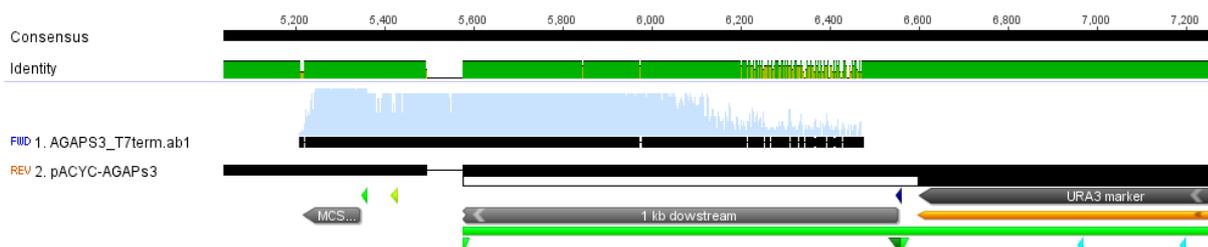


Figure 33 : Séquencage de pACYC AGAPs3 permettant d'observer la jonction entre DN et le pACYCduet1

ANNEXE N°3 : pCOLA AGAPv1

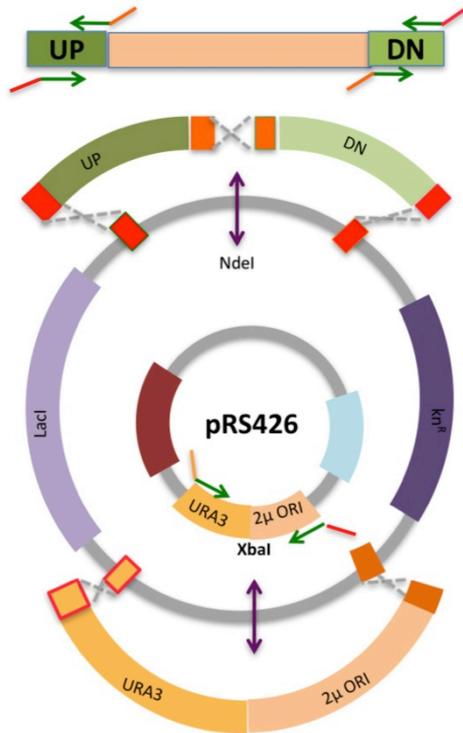


Figure 34 : Design de la construction de pCOLA AGAPv1 avec la position des primers

Nom de l'insert	Primer Forward	Primer Reverse	Template
YCC (ura3+ori)	YCC ACYC F XbaI	YCC ACYC R XbaI	pRS426
UP	CAGAPv1_F	Reverse 1 kb upstream	ADNg <i>P.extremaustralis</i>
DN	Forward 1 kb downstream	CAGAPv1_R	ADNg <i>P.extremaustralis</i>

Figure 35 : Primers et template utilisés pour amplifier par PCR les fragments de pCOLA AGAPv1, voir MM pour séquence des primer

## ANNEXE N°4

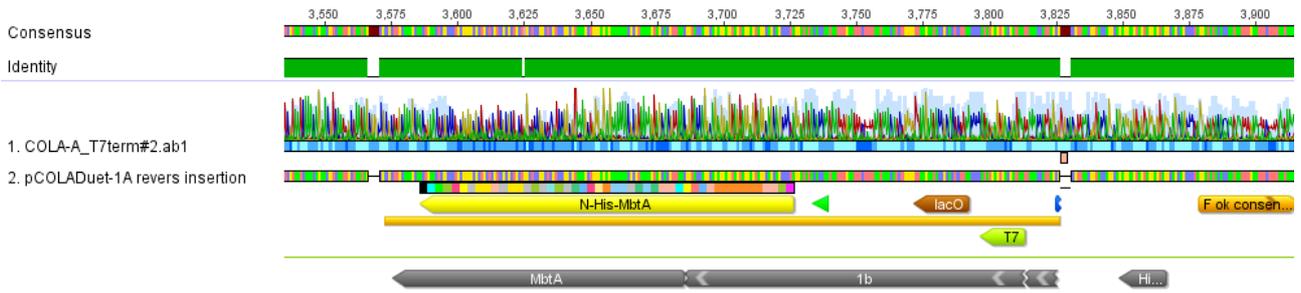


Figure 36 : Séquençage de pCOLA\_mbnA avec l'amorce T7term

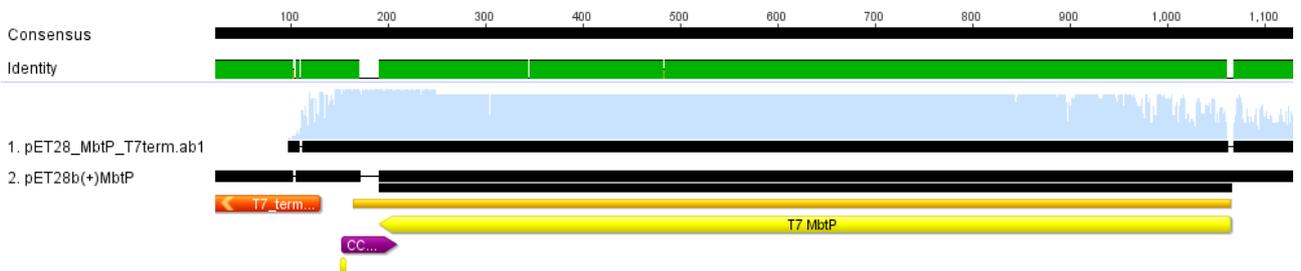


Figure 37 : Séquençage de pET28\_mbnP avec l'amorce T7term

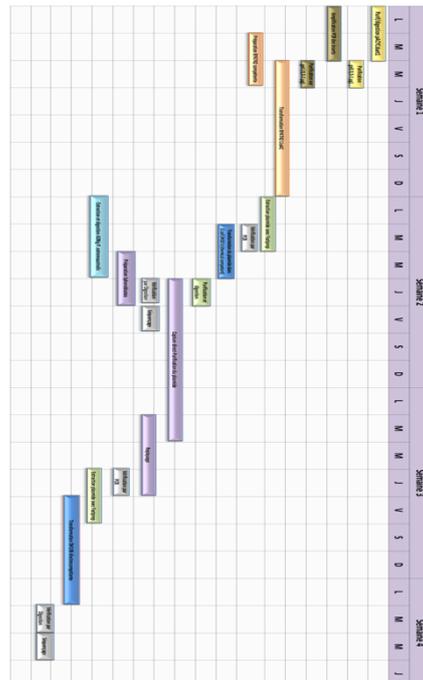


Figure 38 : Diagramme de Grandt proposant un planning avec l'ensemble des étapes nécessaires à la capture d'un cluster de biosynthèse d'une souche procaryote

## ANNEXE n°5

### Liste des amorces utilisés pour ces travaux.

Name	Séquence 5' -> 3'
YCC ACYC F_XbaI	GAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTTGGTTCGCGCACATTTCC
YCC ACYC R_XbaI	TACATTTGAAGAGATAAATTGCACTGAAATCTAGTGAGTTTAGTATACATGC
Forward 1 kb upstream	ATTTTGTTTAACTTTAATAAAGGAGATATAACCATGCTCTCCAACAGGCACC
Reverse 1kb upstream	CGTACCACGTCGACCTGC
Forwarse 1 kb downstream	GGACTTGATCAAGCAGGTCGACGTGGTACGACTAGTACACAGGCTTCCTGATGACC
Reverse 1 kb downstream	GGCTGTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCATGGGCGATGTCGGCTTTCAT
2microori reverse	TTTGAAGAGATAAATTGCACTGAAATCTAGGATTTATCTTCGTTTCC
URA 3 forward	GGACTTGATCAAGCAGGTCGACGTGGTACGATGTCGAAAGCTACATATAAGG
Ura3 reverse	GAAAGCTATTGGTCATCAGGAAGCCTGTGTACTAGTTGAGTTTAGTATACATGC
1 kb Dn forward	ACACAGGCTTCCTGATGACC
ACYC_F1	ATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTC
ACYC_R1	GTATATCTCCTTATTAAGTTAAAC
ACYC_R2	ATATTTTATCTGATTAATAAGATG
ACYC_F2	GCAGCAGCCATCACCATCATC
URA_F3	ACTGCGCGCCGTTTTCTCAGACTCTGCCTATGTCGAAAGCTACATATAAGG
UP2_R	AGGCAGAGTCTGAGG
UP2a_F	CAATCCCCTGTGAAATAATTTGTTTAACACGTAGTGTCTGAATTG
LacO_R	GTAAACAAAATTATTTTC
MbtA_F	GCATACGAGCTCGCATTAGGAAATTAATACGAC
MbtA_R	CGTTAAGCGGCCGCGCAAGCTTTGCTTCAGTTC
MbtB_F	GCTTACDGGCCGCTAATACGACTCACTATAGG
MbtB_R	GCCAATTGGCGGCCGCTCATGACTGAAGCGCC
MbtCa_F	GCTTACGCGGCCGCTTAATACGACTCACTATAGG
MbtCa_R	GGATTTACTCGAGTCAACGAGGCACATCGG
MbtP_F	GCATTACATATGCGTTCATTATCCG
MbtP_F2	GCTTATCTCGAGGAAATTAATACGAC
MbtP_R	CCTAAGCTCGAGCCTAGGAAAGCGCCTGCAGTCATGGCTTTTGACG
MbtH_F	GCTTATCACATATGTTGACCGCGGGCTGC
MbtH_F2	GCTTTAACTGCAGTAATACGACTCACTATAG
MbtH_R	CTGAGCCTCGAGCCTAGGTCAGTGTTTGTGCTTCC
AGAPSCheck_R	GACAATTCTGCTAAC
AGAPSCheck_F	GGTAATCTCCGAACAG
YCC_F2	GATCCTTTACGGATTCCCGACACCATCACTGGTTCGCGCACATTTCC
CAGAPv1_F	GTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACACATGCTCTCCAACAGGC
CAGAPv1_R	CCGGCCGATATCCAATTGAGATCTGCCATAGGCGATGTCGGCTTTCATC
MbtB_Fa	GCTTACDAAGCTTTAATACGACTCACTATAG
URAP_F	CTGCGCGCCGTTTTCTCAGACTCTGCCTAGCTTTTCAATTCAATTCATC
ORiv3_R	CATTTGAAGAGATAAATTGCACTGAAATCTAGGGTGGTATGGTGCCTCTC
R1_F	ATTTTGTTTAACTTTAATAAAGGAGATATACATGCTGCTATGACCCAGGTCG
R1_R	CCAGTAGTCTCGACTCATGGC
R2_F	GCGTCAAAAAGCCATGAGTCGAG
R2_R	GGCCTACGTTTTTACTGTTGG
R3_F	CGATCAGTTGCCAACAGTAAAC
R3_R	GTTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCATGCCTGTGTTATGCCTGCTTTTACG
R1_F_COLA	GTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACAATGCCTGCTATGACCCAGGTC
R3_R_COLA	CCGGCCGATATCCAATTGAGATCTGCCATACCTGTGTTATGCCTGCTTTTAC

